

Biológiailag aktív peptidek oldékonyságának növelése oligoetilénglikol származékokkal

Doktori értekezés

Bartos Ádám

Témavezetők:

Dr. Uray Katalin

Dr. Hudecz Ferenc

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

ELTE Szerves Kémiai Tanszék

ELTE-TTK Kémia Doktori Iskola

Vezető: Inzelt György, D.Sc.

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

Programvezető: Horváth István Tamás, D.Sc.

2008.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Hollósi Miklós, Dr. Perczel András tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy munkámat az ELTE Szerves Kémia tanszékén lehetővé tették,

Témavezetőimnek, Dr. Hudecz Ferenc tudományos tanácsadónak az MTA Peptidkémiai csoport vezetőjének és Dr. Uray Katalin tudományos főmunkatársnak, hogy végig támogattak doktori munkám során,

Medzihradzskyné Dr. Schweiger Hedvig és Dr. Bösze Szilvia tudományos főmunkatársaknak az analitikai vizsgálatokért,

Dr. Schlosser Gitta tudományos munkatársnak a peptidek tömegspektrometriával történő azonosításáért,

Horváti Katának a tömegspektrometriás vizsgálatokért, valamint a sejtlaboratóriumban nyújtott szakmai segítségért,

Dr. Farkas Vikornak és Dr. Kocsis Lászlónak a hasznos tanácsokért, és a támogatásért

Köszönöm az ELTE Doktori iskolának, hogy lehetővé tette doktori munkámat, továbbá az alábbi anyagi források tették lehetővé doktori munkám elvégzését:

OTKA N^o K61518

GVOP-3.1.1.-2004-05-0183/3.0

GVOP-3.2.1-2004-04-0005/3.0.

Köszönöm szüleimnek, családomnak, Ritának, a türelmet és a nyugodt háttérrel, amivel végig segítettek a doktori munkám során.

Rövidítésjegyzék

Az aminosavak rövidítésére az irodalomban használt 1- és 3-betűs rövidítéseket alkalmaztam (1).

AAA	aminosav analízis
AUC	Area Under the Curve (csúcs alatti terület)
Boc	<i>t</i> -butiloxikarbonil
BOP	benzotriazol-1-il-oxi-trisz-(dimetil-amino)-foszfónium- hexafluoro-foszfát
Bzl	benzil
CoA	koenzim-A
CM	teljes médium
CP	H-C(Acm)VVVDVSHEDP-NH ₂
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DCM	diklórmétán
DCU	<i>N,N'</i> -diciklohexilurea
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
ED	H-EVDC(Acm)VVVD-NH ₂
EDA	1,2-etilén-diamin
EDT	1,2-etán-ditiol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (enzimkött immunesszé)
EtOAc	etilacetát
EtOH	etanol
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
Fc	fragment crystallisable, ellenanyag állandó, konstans régiója
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil

Fmoc-Osu	9-fluorenilmetoxikarbonil- <i>N</i> -oxi-szukcinimid
HF	hidrogén-fluorid
HOBt	1-hidroxibenztriazol
HOPcp	pentaklór-fenol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IC ₅₀	az 50%-os inhibícióhoz szükséges koncentráció
ICM	szérummentes médium
IgG	immunglobulin G
MBHA	4-metilbenzhidrilamin-gyanta
MS	tömegspektrometria
MeOH	metanol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid
NHS	<i>N</i> -hidroxi-szukcinimid
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidon
OPcp	pentaklórfenil-észter
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell Perifériás egymagvú vérsejt
PEG	polietilén-glikol
PyBOP	benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofoszfónium hexafluorofoszfát
tBu	<i>t</i> -butil
TEG	3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav
TFA	trifluorecetsav
TFMSA	trifluormetánszulfonsav
TTD	4,7,10-trioxa-1,13-tridekán-diamin
TTD-Su	amino-4,7,10-trioxa-1,13-tridekánamid-borostyánkősav
VP	H-VVDVSHEDP-NH ₂
Z	benziloxikarbonil

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	8
2.	Irodalmi áttekintés	10
2.1.	Poli- és oligoetilénglikolok	10
2.2.	Az avidin – biotin kölcsönhatás, és felhasználása	12
2.3.	Immunglobulin G fehérjék	15
2.4.	Szilárd fázisú peptidszintézis	17
2.4.1.	Történeti áttekintés	17
2.4.2.	Gyanták	19
2.4.3.	A peptidlánc felépítése	21
2.4.4.	Az oldallánc védőcsoportok	22
2.4.5.	A peptidkötés kialakításának módszerei	23
2.4.6.	A kapcsolások követése	25
2.4.7.	A peptidek hasítása a gyantáról	26
2.4.8.	A peptidek tisztítása és azonosítása	27
3.	Célkitűzés és stratégia	28
4.	Eredmények	31
4.1.	A CP és VP peptidek szintézisének eredményei	31
4.2.	Az ED peptid szintézisének eredményei	34
4.3	Oligoetilénglikol származékok	35
4.3.1	3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav (TEG) alapú távtartók	36
4.3.1.1.	Tetraetilénglikol oxidálása	37
4.3.1.2	Tetraetilénglikol heterogén fázisú oxidálása	37
4.3.1.3.	3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav (TEG) aszimmetrikus véde	38
4.3.1.4.	Mono-Boc etilén-diamin (Boc-EDA) és mono-Fmoc etilén-diamin (Fmoc-EDA) előállítás	40
4.3.1.5.	Védett EDA-TEG alapú távtartók szintézise oldatban	41
4.3.2.	4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin (TTD) alapú távtartók	42
4.3.2.1.	Ikerionos szerkezet létrehozása	43
4.3.2.2.	Boc és Fmoc védelem kialakítása TTD-Su távtartón	45
4.3.2.3.	Aktív észter kialakítása	46
4.3.2.4.	TTD alapú távtartók összekapcsolása	47

4.4.	Biotin csoport beépítése (biotinilálás)	48
4.4.1.	Biotinilált peptidek	49
4.4.2.	Biotinilált TEG alapú távtartó szintézise szilárd fázison	51
4.4.3.	Biotinilált TTD alapú távtartók szintézise szilárd fázison	53
4.5.	Biotinilált oligoetilénlikol peptidkonjugátumok	54
4.6.	A konjugátumok oldhatóságának vizsgálata	57
4.6.1.	Oldhatóság meghatározása tömegméréssel	57
4.6.2.	Oldhatóság meghatározása HPLC vizsgálattal	59
4.7.	Citotoxicitás vizsgálatok	62
5.	Eredmények összefoglalása	65
6.	Kísérleti rész	67
6.1.	A CP, VP és ED peptidek szintézise	67
6.1.1.	Peptidszintézis Boc stratégiával	67
6.1.2.	Peptidszintézis Fmoc stratégiával	69
6.2.	3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav alapú távtartók szintézise	70
6.2.1.	TEG szintézise	70
6.2.2.	TEG szintézise heterogén fázisban	71
6.2.3.	TEG-OBu szintézise	72
6.2.4.	Boc-EDA szintézise	73
6.2.5.	Fmoc-EDA szintézise	74
6.2.6.	Boc-EDA-TEG szintézise	75
6.2.7.	Fmoc-EDA-TEG szintézise	76
6.3.	4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin alapú távtartók szintézise	77
6.3.1.	TTD-Su távtartó szintézise	77
6.3.2.	Fmoc-TTD-Su távtartó szintézise	78
6.3.3.	Boc-TTD-Su távtartó szintézise	79
6.3.4.	Boc-TTD-Su-OPCP és Fmoc-TTD-Su-OPcp előállítás	80
6.3.5.	Boc-(TTD-Su) ₂ távtartók szintézise oldatban	81
6.3.6.	Fmoc-(TTD-Su) ₂ távtartók szintézise oldatban	82
6.4.	Biotinilálás	83
6.4.1.	Biotinilált CP, VP, ED peptidek előállítás	83
6.4.2.	TEG alapú biotinilált konjugátumok szintézise	84
6.4.2.1.	Biotin-EDA-TEG szintézise szilárd fázison Boc stratégiával	84
6.4.2.2.	Biotin-EDA-TEG szintézise szilárd fázison Fmoc stratégiával	85

6.4.2.3.	Biotin-EDA-TEG konjugálása ED peptidhez	86
6.4.2.4.	Biotin-EDA-TEG-ED konjugátum előállítása	
	Fmoc-EDA-TEG segítségével	86
6.4.3.	TTD alapú biotinilált konjugátumok	87
6.4.3.1.	Biotin-TTD-Su előállítása oldatban	87
6.4.3.2..	Biotin-(TTD-Su) _n (n=1,2,3) szintézise szilárd fázison Boc stratégiával	88
6.4.3.3.	Biotin-(TTD-Su) _n (n=1,2,3) szintézise szilárd fázison Fmoc stratégiával	89
6.4.3.4.	Biotin-(TTD-Su) _n (n=1,2,3) konjugálása CP és VP peptidekhez	90
6.4.3.5.	Biotin-(TTD-Su) _n (n=1,2,3) felépítése CP és VP peptideken	
	Fmoc stratégiával	90
6.4.3.6.	Biotin-(TTD-Su) _n (n=1,2,3) felépítése CP és VP peptideken	
	Boc stratégiával	91
6.5.	Analitikai módszerek	92
6.5.1.	A kapcsolási és hasítási reakciók követése	92
6.5.2.	HPLC vizsgálatok	93
6.5.3.	Aminosav analízis	94
6.5.4.	Tömegspektrometria	94
6.6.	Oldhatóság vizsgálatok	95
6.6.1.	Oldhatóság mérése HPLC készülékkel	95
6.6.2.	Oldhatóság mérése tömegméréssel	96
6.7.	Citotoxicitási vizsgálatok	97
6.7.1.	PBMC preparálás	97
6.7.2.	A távtartók citotoxicitásának meghatározása kolorimetriás	
	tetrazólium (MTT) teszt alkalmazásával	97
7.	Irodalomjegyzék	99
	Összefoglalás	104
	Summary	105

1. Bevezetés

Mind *in vitro*, mind *in vivo* biológiai vizsgálatok esetén a vizsgálandó molekulák (például peptidek) vízdoldékonysága igen fontos tényező. A vízdoldhatóság problémája többek közt aggregálódásra nagymértékben hajlamos β -redőzött réteg szerkezetű peptidek esetében merül fel. Számos kötődésvizsgálat biotinnal jelzett peptideken alapul (2, 3). A biotin peptidhez való kapcsolása tovább rontja az oldhatóságot, ami főleg hidrofób peptidek esetében megnehezítheti, akár meg is hiúsíthatja ezeket a vizsgálatokat. További probléma, hogy a biotin közvetlen kapcsolása a peptidhez hamis eredményeket adhat, mivel a biotin – avidin kölcsönhatás létrejöttét sztérikus tényezők gátolhatják, vagy az avidin gátolhatja a peptid – receptor kölcsönhatást. A térgátlás kiküszöbölésére egy hosszabb szénláncsal módosított biotint használnak, a biotinil-6-aminohexánsavat, ez azonban tovább rontja az oldhatóságot (4, 5). Biotin csoport beépítése (biotinilálás) minden esetben az oldhatóság csökkenésével jár. Az oldhatóság növelésére kézenfekvő módszer polietilénlikol vegyületek használata, de a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható polietilénlikolok polidiszperz rendszerek, pontos molekulatömeggel nem jellemezhetőek, ami megnehezíti karakterizálásukat.

Célom olyan vízdoldékony peptidkonjugátum előállítás volt, amely a vizsgálandó peptid mellett biotint is tartalmaz. A peptid és a biotin közé olyan oligoetilénlikol alapú hidrofíl távtartókat terveztem, amelyek peptidszintézisben egyszerűen felhasználhatóak. A távtartók tervezésénél fontos kritérium volt, hogy védett amino-terminálissal rendelkezzenek, valamint karboxilcsoportot is tartalmazzanak, hogy tetszőleges peptid *N*-terminálisához egy lépésben kapcsolhatóak legyenek. Az oldékonyság növelésére két olyan egyszerű oligoetilénlikolt használtam fel, amelyek kereskedelmi forgalomban kaphatók; és a doktori disszertációmban bemutatom, milyen derivatizációs lépésekkel lehet őket aminosav típusú távtartókká alakítani. Az aminosav típusú – védőcsoporttal ellátott amino-terminális, valamint egy szabad karboxil csoportot tartalmazó – vegyületek használata igen előnyös, mivel a peptidkémiaiban alkalmazott általános módszerekkel felhasználhatóak a szintézisben. Ezek a vegyületek amellet, hogy a rosszul oldódó biotinilált peptidek oldhatóságát növelik, más hidrofób konjugátumok vízben való oldhatóságát is elősegíthetik. További előnyük, hogy jól jellemezhető molekulatömeggel rendelkeznek, ellentétben a polietilénlikol konjugátumokkal.

Doktori munkám peptidek szintéziséből, hidrofíl távtartók előállításából, valamint a biotin tartalmú konjugátumok szintéziséiből, és vizsgálatukból áll. E célra a humán IgG egyik hidrofób szekvenciáját, és annak rövidebb változatát állítottam elő, melynek biotinilált formáit ELISA vizsgálatokban használják (6). A hidrofíl távtartók előállításához két oligoetilénglikolt használtam kiindulási anyagként, egy dikarbonsav (3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav, TEG) és egy diamin (4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin, TTD) alapú oligoetilénglikolt. Az oligoetilénglikol távtartókat a biotin és a peptid közé illesztve az megnöveli a konjugátum oldhatóságát. Az elkészült konjugátumok oldhatóságát kétféle módszerrel vizsgáltam meg. Megvizsgáltuk továbbá, hogy a létrehozott távtartó citotoxikus hatással rendelkezik-e, mivel ez fontos szempont további felhasználhatóságánál (például gyógyszerhatóanyagok oldatba vitelénél).

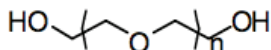
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Poli- és oligoetilénlikolok

Az etilénlikolok neutrális poliéterek (1. ábra), amelyeket számos ipari és kutatási területen, főleg a biotechnológia területén alkalmaznak. Monomerje az etilénlikol, egy mérgező, sűrűn folyó folyadék. Egyszerűbb elnevezése a glikol. A nagy viszkozitás oka az, hogy molekulái között erős hidrogénkötések alakulnak ki. Vízzel kiválóan elegyedik, de apoláris oldószerektől különválik. A molekula poláris részének hatása erősebb. A vízmolekulákkal erős hidrogénkötést képez, ami megakadályozza a szabályos jégkristályok kialakulását. Ennek eredményeképpen a glikollal elegyített víznek nagyon alacsony az olvadáspontja. Az 50%-os töménységű glikol $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagy meg, ezért használják fagyálló folyadékként az autókban, épületgépészeti csőrendszerekben, vagy repülőgépek felületén végbemenő jégképződés ellen. Ezen kívül felhasználják még poliészter gyártásánál is. Polimerjét, a polietilénlikolt (PEG) is igen széles körben használják. Széles skálán mozog az előállított polietilénlikolok molekulatömege 300 g/mol -tól egészen $10\,000\,000\text{ g/mol}$ -ig. Általános molekulaképletük a $\text{C}_{2n+2}\text{H}_{4n+6}\text{O}_{n+2}$ képlettel írható le, általános molekulatömegük pedig $44n+62$ képlettel adható meg. Az 1000 Da -nál nagyobb molekulatömegű polietilénlikolok szilárd, fehér anyagok, 1000 Da alatt szintelen olajok. Oldódnak vízben és a legtöbb szerves oldószerben.

Az oligoetilénlikolok felhasználása igen széleskörű. A kozmetikai- és élelmiszeripar fontos adalékanyagai. Klinikai felhasználásuk is igen megnövekedett az utóbbi években. Kiválóan alkalmazhatók peptidok és fehérjék oldatba viteléhez, amelyekkel nem immunizáló és nem antigén tulajdonságú aktív konjugátumokat adnak, ezáltal növelik a felezési időt a szérumban, emellett különböző felületekhez kötve nagymértékben késleltetik a fehérjék adszorpcióját a felületen. Oldhatósági tulajdonságaiknak köszönhető sokrétű felhasználásuk is, hiszen a vizsgálandó anyag oldhatóságát növelik vizes oldatokban, és szerves oldószerekben egyaránt. A polietilénlikolok egyaránt használhatók hordozóként fehérjék, enzimek, peptidok, zsírsavak, nukleinsavak szintézisében, valamint oldószerként. A szérumfehérjékhez, gyógyszer szállító molekulákhoz kapcsolt polietilénlikolok csökkentik a vérből történő eliminációt, valamint a hidrolitikus hasítás sebességét. A konjugáció során a kiindulási gyógyszer molekula molekulatömege jelentősen megnő, ezáltal csökken a vesében történő kiválasztódás veszélye, viszont növeli a hatóanyag ellenállását a proteolitikus enzimek

és retikuloendoteliális rendszerrel szemben. A polietilén-glikolok elterjedését és széles körű felhasználhatóságát bizonyítja, hogy a gyógyszeripar által már kereskedelmi forgalomban is elérhető számos PEG-konjugátum (PEGASYS, PEG-Intron, Oncaspar, Adagen, Neulasta, Doxil). A kereskedelmi forgalomban különböző tömegű, többféleképpen aktivált PEG módosulat is elérhető. Az aktivált hidroxilcsoporttal rendelkező, kovalens kötés létrehozására alkalmas polietilén-glikolokat alkalmazzák legelterjedtebben konjugálási célokra, de számos más formában is hozzáférhetőek (szukcinimid észter, maleimid, aldehid, stb.) (7-9).



1. ábra: Polietilén-glikolok általános szerkezete

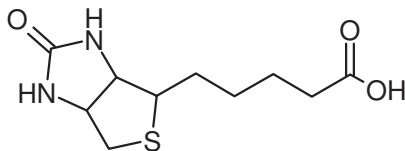
Peptidkémiai vonatkozásban számos polietilén-glikol távtartót írtak le az irodalomban (10,11), amelyet peptidek oldhatóságának növelésére alkalmaztak. Számos irodalmi hivatkozást találunk különféle kapcsolási módokkal előállított biotinilált peptid- és fehérjekonjugátumokról, melyek különböző hosszúságú polietilén-glikol távtartókat tartalmaznak. Lee és Park (12) biotinyl-PEG₃₄₀₀-N-hidroxiszukcinimidet, Wu és Pardridge (13) biotinil-PEG₂₀₀₀-hidrazid változatokat állítottak elő. Salem és munkatársai (14) politejsav-PEG₃₄₀₀-biotin jelölt vegyületeket használtak biomolekulák immobilizására szilárd fázison. Kaiser és munkatársai fehérjét jelöltek szulfhidril csoporton keresztül (15) biotinilált 3-(4-piridilditio)-propionil-PEG₈₀₀ konjugátummal és biotinil-PEG₁₉₀₀ konjugátummal.

Mivel a polietilén-glikolok polidiszperz rendszerek, ezért Mack és munkatársai (16) rövidebb tetraetilén-glikol-származékot készítettek, mely β -Ala és/vagy Gly hosszabbítással rendelkezett, és a biotin és peptid közé építették be a jobb karakterizálásért és a jobb oldhatóságért, azonban nem mérték ezeknek a vegyületeknek az oldhatósági tulajdonságát.

2.2. Az avidin-biotin kölcsönhatás és felhasználása

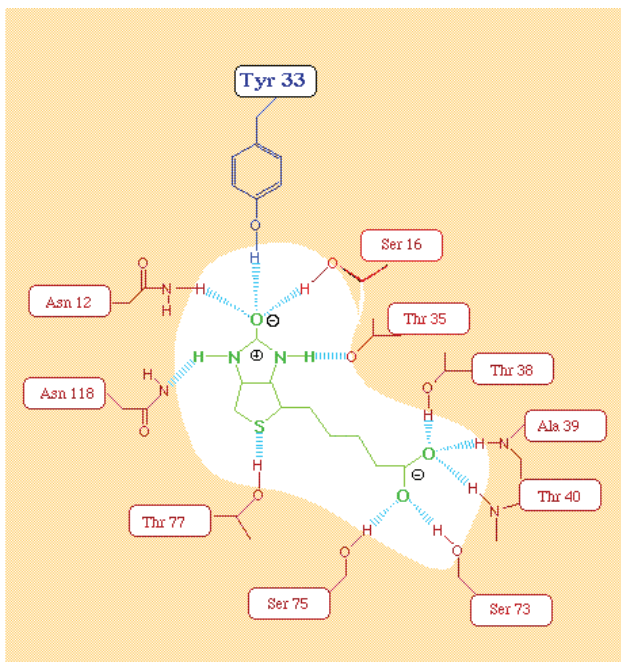
A biotin (B₈, H vitamin, Koenzim R, Bioepiderm) kéntartalmú vitamin (2. ábra), négy karboxiláló enzim, az acetyl-CoA karboxiláz, propionil CoA karboxiláz, β -metil-krotonil CoA karboxiláz, valamint a piroszőlősav karboxiláz koenzime. A zsírsavak előállításában, a szénhidrát-felhasználásban és az aminosav anyagcserében van lényeges szerepe. A biotin, jelenlegi ismereteink szerint, a DNS replikációban és a transzkripcióban is részt vesz.

A biotin szabad és kötött formában lehet jelen ételeinkben. A nyers tojásfehérje avidin glikoproteinje meggátolja a felszívódást, hiánytüneteket hozhat létre. Étrendkiegészítőkben biotinként, vagy a biocytin néven futó sörélesztő készítményként vásárolható meg önmagában, amely 65,6 %-os biotintartalmú. A bélbaktériumok is előállítják. Naponta 10-50 mg-ot fogyasztunk el átlagos vegyes táplálkozás mellett, ami fedezi az igényt. Hiánya fáradtsággal, étvágyvesztéssel, bőrproblémákkal, vérszegénységgel, érzékszavarokkal, koleszterinszint emelkedéssel járhat. Hiányállapot rövidbél szindrómában, helytelen táplálkozás vagy felszívódási zavarok következtében is előfordulhat, ugyanezt idézheti elő a nyers tojásfehérje tartós és nagy mennyiségű fogyasztása is. Hozzásegít az erősebb, egészségesebb körmökhöz, hajhoz (hiánya hajhullást okozhat). A sejtek inzulinérzékenységet növeli, ezért cukorbetegségben előnyös lehet orvosi kontroll melletti használata. A cukorbetegség következtében fellépő idegkárosodás ellen is védelmet adhat. A biotin növeli az inzulinérzékenységet, és fokozza a glukokináz enzim aktivitását. A glukokináz a máj glükóz felhasználásáért felelős, a biotin, különösen magas dózisokban, csökkentheti a vércukorszintet (17).



2. ábra. A biotin szerkezete

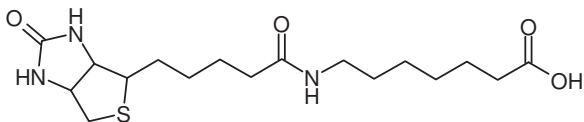
Az avidin a tojásfehérje egyik glikoprotein komponense, az összfehérje tartalom 0,05%-a. Homotetramer, tömege 66 kDa, maximálisan 4 biotint képes megkötni. A biotint irreverzibilisen köti meg, ezáltal a biotin nem képes felszívódni a tápcsatornában. Naponta 20 db nyers tojásfehérje feletti mennyiség elfogyasztása okoz hiánytüneteket. Denaturációjával biotinkötő képességét elveszti. Az avidin és biotin között (3. ábra) létrejövő kölcsönhatás ($K_D=1,3 \times 10^{-15}$ M) a biológiai rendszerekben eddig ismert legerősebb nemkovalens jellegű kölcsönhatás, amely ellenáll extrém pH értékeknek, proteázoknak, valamint egyes denaturációs folyamatoknak is (18).



3. ábra: Az avidin-biotin kölcsönhatásban résztvevő aminosavak

Az avidin-biotin kölcsönhatást először Heitzmann és Richards alkalmazta affinitás citokémiai próbához (19). 1976-ban Bayer, Wilchek és Skutelsky használt biotinilált antitesteket receptorok lokalizálására, valamint biotinilált antigéneket eritrocita membránokon (20).

Számos biológiai kötődési módszer alapja a peptid – receptor, vagy peptid – ellenanyag kötődés vizsgálata. Erre a célra a vizsgálandó peptidet gyakran biotinnal jelölik (21, 22), melyet egy sztreptavidin-filmmel bevont lemezre kötnek. Ennek a módszernek két hátránya van. Az egyik, hogy a biotin közvetlenül a peptidhez kapcsolódik, ami zavarhatja a kötődési vizsgálatokat. Ebben az esetben egy távolságtartó, hosszabb szénláncot tartalmazó biotinszármazékot alkalmaznak, például a biotinil-6-aminohexánsavat (4. ábra). A módszer másik hátránya, hogy vízben nem, vagy rosszul oldódó peptidekre nehezen alkalmazható, mert a biotin peptidhez kapcsolása tovább csökkenti a vízzoldékonyságot, a vizsgálatok pedig hidrofíl környezetben játszódnak. A biotin oldhatósága vízben 0,22 mg/mL, 95%-os etil-alkoholban 0,80 mg/mL.



4. ábra: A biotinil-6-aminohexánsav

2.3. Immunglobulin G fehérjék

Az antigénspecifikus immunválasz kétféleképpen valósulhat meg. A sejtközvetített, azaz celluláris folyamat során a tímuszban (csecsemőmirigy) fejlődött T-sejtek úgynevezett antigénprezentáló sejtek révén kerülnek kapcsolatba az antigénnel, és az immunválasz központi szakaszában olyan T-effektorsejtek (citotoxikus T-sejtek) képződhetnek, amelyek képesek az antigént közvetlenül elpusztítani. Humorális immunválasz esetén viszont a csontvelőben kialakuló B-sejtek kapcsolódnak közvetlenül az antigénnel, majd effektorsejtekké, úgynevezett plazmasejtekké alakulva ellenanyagokat termelnek.

Az immunglobulinok több osztályba sorolhatók. Ezek között a fő különbség az ellenanyag-felismerésben, egyes antigén-kötő régióikban, valamint domén-szerkezetükben nyilvánul meg. Az ellenanyagok több mint 75%-át az immunglobulin G típusú fehérjecsald alkotja.

Az immunglobulin G (IgG) kb. 150 kDa tömegű, alacsony szénhidráttartalmú (2-3%) molekula. Négy láncból épül fel, a két úgynevezett nehéz láncból (heavy chain, H), amely 440 aminosavból áll, illetve a két könnyű láncból (light chain, L), amelyet 220 aminosav alkot. Az egyes láncokat diszulfid hidak kapcsolják össze. Az IgG molekulában nyolc konstans (constant, C), illetve négy variábilis (variable, V) domént különíthetünk el.

Az egyes domének mintegy 110 aminosavból álló homológ szakaszok, melyek egymástól független, globuláris egységet alkotnak.

Az immunglobulinok proteolitikus hasítással bonthatók, így például papain hatására három fragmens képződik belőlük. A papain a monomert két Fab (fragment antigen binding) fragmensre és egy Fc (fragment crystallizable) fragmensre hasítja. Egy másik enzim, a pepszin a kapocsrégió alatt hasítja a molekulát, így egy $F(ab)_2$ fragmens és egy Fc fragmens keletkezik: a két Fab, amelyek érdekessége, hogy emésztés után is megtartják ellenanyagsajátosságukat, illetve a harmadik, az Fc, mely képes az Fc receptorhoz kapcsolódni. Nevét kristályosítható jellegéről kapta.

Az immunglobulinok a szervezetbe jutó antigéneket a Fab részen lévő antigén-kötőhellyel ismerik fel és kötik meg. E speciális kölcsönhatás nem vezet közvetlenül az antigén eliminációjához, az számos alkalommal csak akkor következik be, ha az immunkomplexhez (IgG molekula és a hozzá kötött antigén együttese) bizonyos szérumfaktorok, úgynevezett komplementek kapcsolódnak.

A Fab fragmenssel ellentétben az Fc régió ellenanyag-aktivitással nem rendelkezik, mégis fontos szerepet tölt be. A komplementrendszer aktiválásán túl ez a régió felelős az IgG

molekula különböző sejtek Fc receptoraihoz történő kötődéséért, melynek következtében például a B-sejtek aktiválódnak. Sondermann és munkatársai (23) röntgendiffrakciós eljárással valószínűsítették, hogy az IgG Fc régiójának mely részei vesznek részt az Fc receptorhoz való kötődésben. Kutatócsoportunk és az ELTE Immunológia Tanszékének közös kutatásai részben igazolták e peptidszakaszok szerepét a kötődésben (6).

2.4. Szilárd fázisú peptidszintézis

2.4.1. Történeti áttekintés

A peptidek szerkezete és biológiai hatása közötti összefüggések vizsgálata du Vigneaud oxitocin szintézisével kezdődött (24). A kilenc aminosavból álló oxitocint oldatfázisú peptidszintézis módszerével állították elő, és megállapították, hogy a peptid biológiai aktivitása megegyezett a természetes eredetű peptidével. Az oxitocin szintézise azonban tapasztalt vegyészek több hónapos munkáját igényelte. Az oldatfázisú peptidszintézis nagy idő- és munkaigénye indította Merrifieldet a szilárd fázisú peptidszintézis elvének kidolgozására (25).

A 60-as években a legfőbb korlátot az oldatfázisú szintézisben szükséges rengeteg reakciólépés, beleértve a reakciókat követő izolálási és tisztítási lépéseket is, a növekvő peptidlánc romló oldhatósága és a kapcsolások során tapasztalt racemizáció jelentette. A problémák megoldására először a fragmenskondenzációs eljárásokat fejlesztették ki, a részleges oldalláncvédelemmel kombinálva. Ennek során kisebb, még oldható peptideket kapcsoltak össze, így állítva elő nagyobb, kevésbé oldható végterméket. Azonban a mellékreakciók nagy száma miatt újabb módszer kidolgozására volt szükség. 1963-ban az oldatfázisú peptidszintézis módszere már igen fejlett volt. A peptidkötések kialakítását különféle módszerekkel végezték. Alkalmazták mind a fragmenskondenzáción alapuló, mind a lépésenkénti eljárást. Merrifield a lépések ciklikus ismétlődését használta fel a szilárd fázisú peptidszintézis kidolgozásához, amely lehetővé tette később a módszer automatizálását. A módszer kialakításánál figyelembe vette az oldatfázisú szintézisből már ismert kapcsolási reakciókat és védőcsoportokat. Ez hatalmas előrelépést jelentett, hiszen felváltotta a nagy idő- és munkaigényű oldatfázisú szintézist. Ennek ellenére a mai napig használják az oldatfázisú szintézist is, de elsősorban csak egyes érzékenyebb aminosavakat tartalmazó peptidek esetében. A 80-as években a Carpino kifejlesztette a 9-fluorenil-metiloxi-karbonil (Fmoc) (26) védőcsoportot, amelyet Sheppard *tercier*-butil alapú oldalláncvédelemmel párosított (27).

A szilárd fázisú peptidszintézis során az aminosavak egymáshoz kapcsolása szilárd, oldhatatlan hordozón, úgynevezett gyantán történik, amelyre első lépésben a peptid C-terminálisán lévő aminosavat kapcsoljuk fel kovalens kötéssel. A további aminosavakat ehhez a hordozóhoz kötött aminosavhoz kapcsoljuk, így a növekvő peptid a szintézis végéig a szilárd hordozón marad. A módszer nagy előnye, hogy nincs szükség lépésenkénti tisztításra,

mert a gyantához kötött peptidet a szintézis folyamán egyszerűen, oldószerrel történő mosásokkal lehet elválasztani a kapcsolóreagensektől, valamint a feleslegben lévő aminosav-származékoktól.

A szintézis igen kevés eszközt igényel, mindössze egy üvegfrittel ellátott edényt, mely vákuum létrehozására alkalmas berendezéssel van összeköttetésben. Lehetőség van a módszer automatizálására is, hiszen a szintézis azonos lépések ismétlődő ciklusából áll.

A szilárd fázisú szintézis egyik hátránya, hogy mellékreakciók következtében rövidebb vagy hiányos szekvenciák keletkezhetnek, ha például a kapcsolási reakció vagy a védőcsoportok eltávolítása nem ment végbe teljesen. Ezek a hibalehetőségek elkerülhetők, ha a reagensekből nagyobb felesleget alkalmazunk, illetve a kapcsolásokat szükség esetén ismételjük.

Hosszabb peptidek esetén előfordul, hogy a hibás (hiányos, vagy oldallánc-védőcsoportot tartalmazó) peptid tulajdonságai csak kis mértékben különböznek a hibátlan peptidétől. A hagyományos preparatív tisztítási módszerekkel (kivétel, kristályosítás, kromatográfiás eljárások) ezen peptideket nem, vagy csak nagyon nehezen lehet elválasztani egymástól. Ezért érthető, hogy a szilárd fázisú peptidszintézist csak a nagyhatékonyságú elválasztástechnikai módszerek kifejlődése és elterjedése után kezdték széles körben használni (pl. HPLC).

A szilárd fázisú peptidszintézisnek két alapszere van. Az egyik esetben az α -aminocsoportokat *t*-butiloxikarbonil (Boc) csoporttal védjük, míg a másik esetben az α -aminocsoport védelmét a 9-fluorenilmetoxikarbonil (Fmoc) csoport biztosítja.

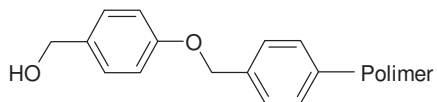
2.4.2. Gyanták

A Merrifield által kezdetben alkalmazott gyanta klórmetil-csoportokkal funkcionizált sztirol – 1 % divinil-benzol kopolimer volt (25). Az aminosavak α -aminocsoportjait benziloxikarbonil (Z) csoporttal védte, amelyet 10 % HBr-t tartalmazó jégecettel távolított el. A brómozott vagy nitrocsoporttal ellátott klórmetil gyanták is csak kevésbé voltak ellenállóbbak a klórmetil gyantánál (28). A benziloxikarbonil (Z) védőcsoport helyett *t*-butiloxikarbonil (Boc) csoportot használva azonban a klórmetil-gyantán sincs számottevő veszteség, ezt a védőcsoportot ugyanis már enyhébb körülmények között (30-50%-os trifluor-ecetsavval) el lehet távolítani. Ha a peptidket savval hasítják a Merrifield gyantáról, akkor szabad karboxil-terminálisú peptidket keletkeznek. Nukleofilekkel (primer aminnal, ammóniával, vagy hidrazinnal) is lehet hasítani a peptidket, ez esetben a C-terminálison primer peptidamidok ($-\text{CONHR}$, $-\text{CONH}_2$), vagy peptid hidrazidok ($-\text{CONHNH}_2$), alkoholízissal peptidészterek ($-\text{COOR}$) nyerhetők (29).

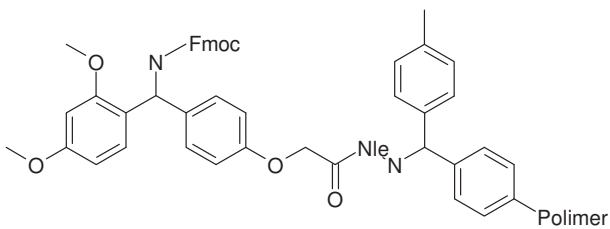
A Matsueda által 1981-ben kidolgozott 4-metil-benzhidrilamin (MBHA) gyantáról savas hasítással közvetlenül kaphatók peptidamidok ($-\text{CONH}_2$) (30).

A módszer fejlődésével a hordozók száma és fajtája is folyamatosan nőtt. A gyanták döntő többsége alacsony keresztkötési fokú gél típusú hordozó. Ezeknél a gyantáknál kulcsfontosságú a jó duzzadási tulajdonság. A hordozó duzzadását különböző oldószerekben alapvetően a kémiai szerkezete és a keresztkötési foka határozza meg. A keresztkötési fok növekedésével az elméleti maximális duzzadási térfogat négyzetesen csökken. A túl alacsony keresztkötés (0,5%) esetén a magas duzzadási érték miatt a gyanta sérülékennyé válik. Figyelembe véve a mechanikai stabilitást és a minél magasabb duzzadási értéket is, napjainkban általánosan 1%-os keresztkötésű kopolimereket használnak.

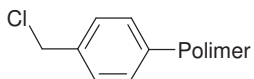
Munkám során Fmoc stratégiánál Wang gyantát, valamint Rink-amid-MBHA (31) gyantát, Boc stratégiánál Merrifield, illetve MBHA gyantát használtam (5. ábra). A hordozóról való savas hasítás után a Wang, illetve a Merrifield hordozó karboxil végződést ad, míg a Rink-amid-MBHA, illetve az MBHA hordozó amid végződést.



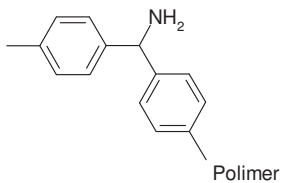
Wang gyanta



Rink-amid-MBHA gyanta



Merrifield gyanta



MBHA gyanta

5. ábra: A felhasznált hordozók szerkezete

2.4.3. A peptidlánc felépítése

A peptidlánc felépítése a szilárd fázisú peptidszintézis módszerével, Boc / Bzl, illetve Fmoc / tBu technika alkalmazásával történhet.

A kezdő lépés az első N^{α} -védett aminosav kapcsolása gyantára. Wang gyanta esetében a gyanta és az aminosav közötti észterkötés kialakításához általában karbodiimid reagens segítségével végzik (32). Mivel az alkoholos hidroxilcsoport gyenge nukleofil, a reakciót báziskatalízissal történik, ehhez leggyakrabban 4-dimetil-amino-piridint (DMAP) használnak (33). MBHA gyanta esetében az első aminosav kapcsolása történhet karbodiimidekkel, szimmetrikus anhidriddel, egyes aktív észterekkel, vagy foszfónium és urónium származékokkal is. Az MBHA gyantát a gyártók általában hidroklorid-sóként hozzák forgalomba, az első aminosav felkapcsolása előtt az aminocsoportot szerves bázissal, például diizopropil-etilaminnal, fel kell szabadítani. Az Fmoc stratégiában használt Rink-amid-MBHA gyanta Fmoc csoporttal védve kerül forgalomba, ezért erről az első aminosav kapcsolása előtt el kell távolítani a védőcsoportot. Merrifield gyanta esetén az első aminosavat cézium-só formájában tudjuk felkapcsolni (34).

A már gyantához kötött aminosav védőcsoportjának lehasítása Boc stratégia esetén trifluor-ecetsavval (TFA), Fmoc stratégia esetén piperidinnel történik. Boc stratégiánál a védőcsoport eltávolítása után az ammóniumsó semlegesítése következik, hogy a következő kapcsolási lépésben az aminocsoport hatékony nukleofilként vegyen részt a reakcióban. Ezután következik az újabb aminosav kapcsolása, s a lépéseket addig ismételjük, míg a kívánt szekvencia fel nem épül. Az egyes reakciók után oldószeres mosásokkal és szűrésekkel távolítjuk el a reagensek feleslegét. A peptidlánc felépítése alatt a kizárólagos tisztítási eljárás a gyanta mosása. Mivel esetenként sem a kapcsolási reakció, sem a védőcsoport eltávolítása nem játszódik le teljesen, kis mennyiségben hiányos szekvenciájú, illetve rövidebb peptidek is keletkezhetnek. Azáltal, hogy e melléktermékek is a gyantához vannak rögzítve, eltávolításuk a gyanta mosásával lehetetlen, így a peptid a szintézis végén a lehasítás után nem lesz homogén. A hibás peptidek mennyisége csökkenthető, ha a kapcsolási és lehasítási reakciók határfoka megközelíti a 100%-ot. Ez a kapcsolási lépés ismétlésével, hosszabb reakcióidővel, vagy a reagensek nagy feleslegének alkalmazásával érhető el. A felesleg a kapcsolási reakció után szűréssel, mosással könnyen eltávolítható.

2.4.4. Az oldallánc védőcsoportok

Két aminosav amino- és karboxilcsoportjának megfelelő irányú összekapcsolása csak az egyéb reaktív csoportok blokkolásával valósítható meg. A szilárd fázisú peptidszintézis során az összes trifunkciós aminosav oldalláncát védeni kell, ellenkező esetben melléktermékek (pl. elágazó láncú peptidek) is keletkezhetnek. Olyan oldallánc-védőcsoportokat kell használni, amelyek a Boc, illetve Fmoc védőcsoport lehasításakor nem, a peptidek gyantáról való lehasításakor viszont távoznak a peptidről. A szilárd fázisú peptidszintézisben két meghatározó védőcsoport kombinációt használnak.

A Boc/Bzl stratégia elve azonos az oldatfázisban is használttal. A legjobban automatizálható kombináció a 9-fluorenil-metiloxi-karbonil (Fmoc) átmeneti α -aminocsoport védelem *t*-butil alapú oldallánc védőcsoportokkal kiegészítve (Fmoc/*t*Bu) (35, 36). Az általam használt aminosavakat és az alkalmazott oldallánc-védőcsoportokat az 1. táblázat foglalja össze. Ezeken az aminosavakon kívül prolint és valint használtam, melyek nem igényelnek oldalláncvédelmet.

Aminosav			Oldallánc funkció	Fmoc/ <i>t</i> Bu védőcsoport	Boc/Bzl védőcsoport
C	Cys	Cisztein	tiol	acetamidometil	acetamidometil
D	Asp	Aszparaginsav	karbonsav	<i>t</i> -butil-észter	benzilészter
E	Glu	Glutaminsav	karbonsav	<i>t</i> -butil-észter	benzilészter
H	His	Hisztidin	imidazol	tritol	benziloximetil
S	Ser	Szerin	hidroxil	<i>t</i> -butil-éter	benzil-éter
T	Thr	Treonin	hidroxil	<i>t</i> -butil-éter	benzil-éter

1. táblázat: A felhasznált aminosavak és védőcsoportjaik

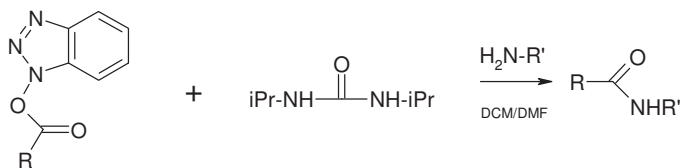
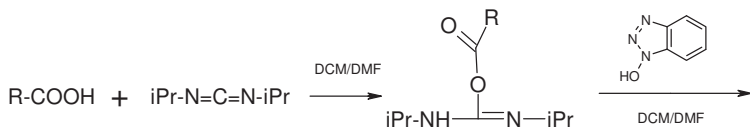
2.4.5. A peptidkötés kialakításának módszerei

Az aminosav-származékok kapcsolása a növekvő peptidszakaszhoz többféle módon történhet. Elterjedten alkalmazzák az anhidrides (főleg oldatfázisban), aktív észteres, karbodiimides (*N,N'*-diciklohexil-karbodiimides illetve a *N,N'*-diizopropil-karbodiimides) acilezést is.

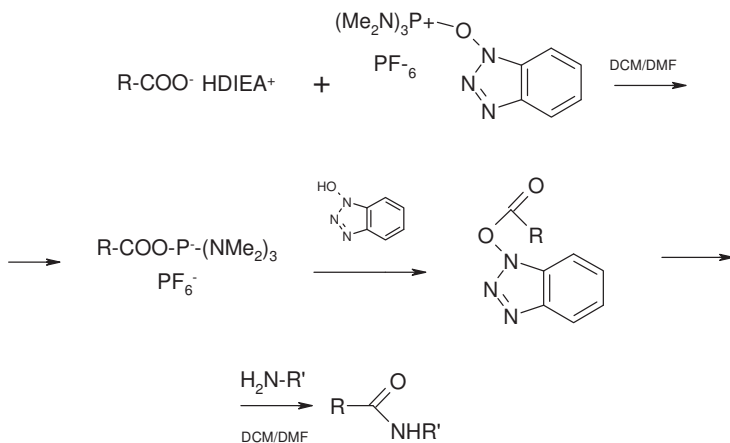
Az anhidrides eljárásban két ekvivalens védett aminosav és ekvivalens karbodiimid reakciójával nyernek szimmetrikus anhidridet, és a keletkező urea-származékot kiszűrik, mielőtt az anhidridet a gyantához adják. Ez a módszer minimális melléktermék-képződéshez vezet, hiszen a kapcsolóreagens nem kerül a reakcióelegybe, viszont az aminosav 50%-a használdik fel, ami esetenként megdrágíthatja a szintézist. Az anhidrid ezenkívül nem minden esetben stabil, tehát csak közvetlenül a kapcsolási reakció előtt célszerű elkészíteni. A vegyes anhidridek alkalmazása olcsóbb, de az anhidrid két irányban lehetséges felnyílása ismét mellékreakcióhoz vezethet.

Gyakran használják a védett aminosavak aktivált észtereit, melyek általában stabil, kristályos vegyületek, így előre elkészíthetők, és jól tárolhatók. A védett aminosavak elektronvonzó csoportokkal szubsztituált fenilészterei általában az anhidrideknél lassabban reagálnak, de közülük kitűnik a pentafluor-fenil-észter (37), amely különösen 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) jelenlétében a szimmetrikus anhidridhez hasonló reaktivitással. Az aminosavak 1-hidroxi-benzotriazollal kialakított aktív észtereinek használata is gyakori, az észterkötést szintén karbodiimid reagenssel alakítják ki *in situ*, közvetlenül a kapcsolás előtt, és izolálás nélkül használják fel, mert nem stabil (6. ábra) (32). A HOBt helyett Carpino (38) a hatékonyabb kapcsolást lehetővé tevő 1-hidroxi-7-azabenzotriazolt javasolja az aktív észter kialakítására.

A későbbiekben a benzotriazol és a 3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin foszfónium- és urónium-származékaira terelődött a figyelem, melyeknek általában hexafluoro-foszfát vagy tetrafluoro-borát sóit használják. A kapcsolás során az aminosav benzotriazol észtere, illetve aza-benzotriazol-észtere az acilező reagens. Carpino és munkatársai (39) az aza-benzotriazol alapú reagenst találták a leghatékonyabbnak peptidszintézisben, az acilezési reakció szomszédcsoporthézagával meggyégbe. Hatékony kapcsolóreagens a benzotriazol-1-il-oxotrisz-(dimetil-amino)-foszfónium-hexafluoro-foszfát (BOP) (40). Az ezzel végrehajtott reakció bázis (pl. diizopropil-etilamin) és HOBt jelenlétében használható, a folyamat során aktív észter jellegű intermedierek keletkeznek. A reakció mechanizmusa a 7. ábrán látható (41).

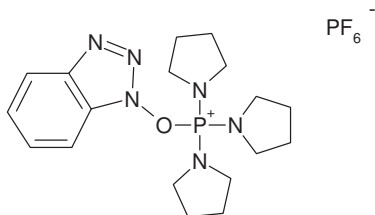


6. ábra: A DIC/HOBt kapcsolás mechanizmusa



7. ábra: A BOP/HOBt kapcsolás mechanizmusa

A BOP reagens alkalmazásának nagy hátránya, hogy mellékterméke, a hexametil-foszfamid rákkeltő hatású. A kereskedelmi forgalomban megjelent a BOP reagens egyik derivatizált változata a benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofoszfónium hexafluorofoszfát (PyBOP) (8. ábra), melynek nagy előnye a BOP reagenssel szemben, hogy a reakció során nem ad karcinogén mellékterméket.



8. ábra: A PyBOP kapcsolóreagens szerkezete

2.4.6. A kapcsolások követése

A szilárd fázisú peptidszintézis módszerének előnye, hogy sokszoros reagensfelesleg használatát teszi lehetővé a kapcsolási reakciónál és az α -amino védőcsoport eltávolításánál, így a reakciók nagy hatásfokkal játszódhatnak le. Gyakran azonban még ilyen reakciókörülmények között sem mennek végbe teljes mértékben, tehát fontos a kapcsolás, illetve a védőcsoport eltávolítás hatékonyságának ellenőrzése.

A Kaiser által kifejlesztett ninhidrin próba (42) a ninhidrin és a szabad aminocsoport közötti színreakción alapul. Gyors, érzékeny, és könnyen kivitelezhető módszer, 1% szabad aminocsoport jelenlétét még észlelhető kék szín jelzi.

Mivel a prolin nem amino-, hanem iminosav, nem képes a ninhidrinnel megfelelő színreakcióra, ezért más módszer kidolgozása volt szükséges. A 2,3-indolin-dion (izatin) például a Kaiser-féle reagensekhez adva specifikusan kimutatja a szekunder aminokat (43). Fmoc stratégia esetén a védőcsoport jelenléte, vagy eltávolításának mértéke azonban spektroszkópai módszerekkel is követhető az acilezési reakció, vagy a védőcsoport eltávolítása után 300-312 nm-en (44).

2.4.7. A peptidek hasítása gyantáról

Boc / Bzl stratégiánál a szilárd hordozóról való hasítás gyakran folyékony hidrogén-fluoriddal (HF) történik 0 °C hőmérsékleten. A hidrogén-fluoridos hasítás körülményei között jelentős karbokation képződés tapasztalható, ami alkilezheti a His, a Cys és egyéb aminosavak nukleofil oldalláncát. Ezek a mellékreakciók azonban megfelelő gyökfogókkal vagy az úgynevezett „low-high” HF-os hasítás eljárással nagyrészt visszaszoríthatók (45). Az alkileződési mellékreakciók elkerülése miatt általában *p*-krezol gyökfogót használunk. A „low-high” módszer lényege, hogy a gyantán lévő peptidekről először a nagy moláris feleslegben alkalmazott gyökfogókkal, kis koncentrációjú HF-dal eltávolítják az oldallánc-védőcsoportok többségét, majd egy második lépésben nagy koncentrációban alkalmazott HF-dal hasítják le a peptidet a gyantáról a maradék védőcsoportokkal együtt.

A hidrogénfluoridos hasítás után a nyers peptid éterrel kicsapható, így eltávolítható a gyökfogó nagy része, majd a gyantaszemcsék mellől vizes oldattal kioldható.

A HF a környezetre nézve veszélyes, valamint speciális teflon vagy acél eszközöket igényel. Tam és munkatársai (46) kifejlesztettek egy olyan alternatív stratégiát, amelyben trifluor-metán-szulfonsavat használnak. A TFMSA esetén nincs szükség speciális berendezésre, a reakciót közönséges laboratóriumi üvegeszközökben is el lehet végezni. A TFMSA azonban nem képes minden, hidrogén-fluoriddal lehasítható oldalláncvédőcsoportot eltávolítani. A Cys metil-benzil, az Arg tozil, valamint az Asp és Glu ciklohexil-észter védőcsoportjai ellenállnak ennek a savnak.

Az Fmoc / *t*Bu stratégiánál nagy előny, hogy a peptidek a gyantáról hidrogén-fluorid helyett TFA-val hasíthatók, amely egyúttal a legtöbb védőcsoportot is eltávolítja a peptidről. A TFA-as hasítás esetén is keletkezhetnek azonban elektrofil sajátságú melléktermékek (pl. *t*-butil kation), amelyek alkilezhetnek. Amennyiben a peptid nem tartalmaz alkileződésre hajlamos aminosavat, a kevésbé savérzékeny gyanták esetén rendszerint 95%-os vizes TFA-t használnak hasításra. Tyr, Cys, Met esetében, valamint tritil védőcsoportok jelenlétében a víz mellett 5 % etán-ditiolt alkalmaznak (47, 48). A peptidek hasítása a gyantáról általában már 2 óra alatt végbemegy. A nyers peptidet ebben az esetben is éteres kicsapással kaphatjuk meg.

2.4.8. A peptidek tisztítása és azonosítása

A szilárd fázisú peptidszintézissel készült peptideket célszerű HPLC-vel tisztítani, különösen, ha a peptid gyantáról történő lehasításakor többféle gyökfogót alkalmaznak. A peptideket általában fordított fázisú C_{18} oszlopon, HPLC-vel tisztítják (49). Hidrofób peptidek esetén a C_8 oszlopok bizonyos esetekben jobb elválasztást biztosítanak. Leggyakrabban 0,05-0,1% TFA-t tartalmazó eluensrendszert használnak, de különféle puffer-rendszerek is alkalmazhatóak. A jobb elválasztás érdekében célszerű gradiens-elúcióval tisztítani az anyagokat. Ez azt jelenti, hogy fokozatosan változtatjuk az oldószerösszetételt, növelve a szerves oldószer mennyiségét az eluensben. A detektáláshoz leggyakrabban az amidcsoportot használják kromofórként, 210-220 nm-nél vizsgálják az UV elnyelést.

A termék homogenitásának ellenőrzésére analitikai HPLC alkalmazható, azonosítása aminosav-analízissel és tömegspektrometriás méréssel történhet.

Az aminosav-analízis megmutatja, hogy a peptid valóban tartalmazza-e a várt aminosavakat. A vizsgálatot a peptid savas vagy enzimatis hidrolízisével, majd a keletkező aminosavak származékképzés utáni kromatográfiás meghatározásával végzik.

A tömegspektrometria a relatív molekulatömeg meghatározásával bizonyítja a helyes szerkezetet, sőt fragmentációs eljárással bizonyos esetekben igazolható a szekvencia is.

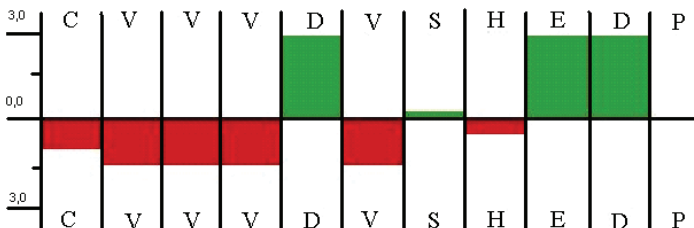
Célkitűzés és stratégia

Célom olyan biotin tartalmú peptidkonjugátum előállítása, amely oligoetilénglikol származékot tartalmaz, így nagyobb a vízoldhatósága, mint az általánosan alkalmazott biotinil-6-amino-héxánsavval jelölt konjugátumoké. Doktori munkám három részből áll:

- I.) a H-C(Acm)VVVVDVSHEDP-NH₂ (CP), H-VVDVSHEDP-NH₂ (VP) illetve H-EVTC(Acm)VVVD-NH₂ (ED) peptidek előállítása
- II.) védett oligoetilénglikol távtartók előállítása és citotoxicitásuk vizsgálata
- III.) biotin tartalmú peptidkonjugátumok előállítása és oldhatóságuk vizsgálata

I.)

Célom olyan tesztpeptidek szintézise volt, melyek alacsony oldhatósággal rendelkeznek vízben. A kiválasztott H-C(Acm)VVVVDVSHEDP-NH₂, H-VVDVSHEDP-NH₂ illetve H-EVTC(Acm)VVVD-NH₂ modell peptidek az IgG Fc régiójából származnak. Célul tűztem ki szintézisük optimalizálását, mivel előállításuk az aggregáció és a hidrofób szekvenciareszletek miatt igen nehéz. Szilárd fázison, kétféle stratégiával terveztem előállítani őket: Boc stratégiával manuálisan, illetve Fmoc technikával automata peptidszintetizátorral. A Hopp-Woods skálán (50) ábrázolva láthatjuk, hogy a hidrofóbitásért nagy részben az egymás mellett lévő valin aminosavak a felelősek (9. ábra). A Hopp-Woods módszer lényege, hogy minden aminosavhoz egy hidrofilitás/hidrofóbitás értéket rendel, amelyből kiszámíthatjuk a hidrofil/hidrofób aminosavarányt, illetve meghatározhatunk egy átlag hidrofilitási értéket. Így a CP peptide-re kapott átlag hidrofilitás érték 0,2, a hidrofil aminosav/teljes aminosav arány pedig 36%.



9. ábra: A CP peptid hidrofóbitásának ábrázolása a Hopp-Woods skálán

Összehasonlítás végett ezért mindkét stratégiával előállítottam a peptideket. Fmoc / tBu stratégiával való szintézis automata peptidszintetizátor segítségével terveztem előállítani, DIC / HOBt kapcsolóreagensek segítségével. Manuális peptidszintézishez Boc / Bzl stratégiával terveztem előállítani a peptideket PyBOP / HOBt kapcsolóreagensek alkalmazásával, úgynevezett *in situ* közömbösítéssel, amely kifejezetten nehéz szekvenciák esetén nyújt segítséget. Az *in situ* közömbösítési eljárásban a Boc védőcsoport trifluorecetsavas eltávolítása után a semlegesítés közvetlenül a kapcsolás során történik. Fmoc / tBu stratégiánál a kész peptid, illetve peptidkonjugátum trifluorecetsav-víz eleggyel hasítható le, Boc / Bzl stratégia esetében folyékony hidrogénfluoriddal.

II.)

A védett oligoetilénglikol távtartók előállításánál fontos szempont volt, hogy aminosav-típusú szerkezetet hozzak létre, tehát egy Fmoc vagy Boc csoporttal védhető amino-terminállissal, valamint egy szabad karboxilcsoporttal rendelkezzen a célvegyület. A kereskedelmi forgalomban kapható két oligoetilénglikolt, a 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsavat, valamint a 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamint terveztem használni kiindulási anyagként.

A 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav esetében az amino-terminális kialakítását védett formában terveztem végrehajtani Boc- illetve Fmoc-védett etilén-diamin (EDA) felhasználásával. Céлом volt az amin és a karbonsav között amidkötés kialakítása a peptidkémiaiában használatos kapcsolóreagensek segítségével, például *N,N'*-diciklohexilkarbodiimiddal (DCC). A dikarbonsav azonban két karboxilcsoportjának köszönhetően mindkét oldalán reakcióképes, amely kétszeresen acilezett melléktermékhez vezethet. Ezért szükségeszerű a dikarbonsav egyik karboxilcsoportját átmeneti védelemmel ellátni. Ezt egy Dowex-ioncserélő gyantán alapuló szelektív átésztereződési eljárással kívántam elérni. Az így kapott félésztert már egyértelműen lehet reagáltatni a védett etilén-diaminnal. Az átmeneti észtervédőcsoport eltávolításával előállítható a Boc, illetve Fmoc védett aminosav típusú távtartó.

A 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin típusú távtartó előállítását egy eltérő eljárással terveztem végrehajtani. A céloom itt is az aminosav-jelleg kialakítása volt. Az amidkötés kialakításának egyik peptidkémiaiában is használt eljárása az anhidridek alkalmazása. Ha azonban gyűrűs anhidridet alkalmazunk (például borostyánkősavanhidridet), a gyűrűfelnyílás során kialakuló amidkötés mellett egy szabad karboxilcsoport is kialakul. Az aminosav-típus

tehát ebben az esetben átmeneti védelem kialakítása nélkül létrehozható. Az izolált ikerionos szerkezetű köztiterméket ezután Boc, illetve Fmoc védelemmel láthatjuk el.

Mivel a későbbiekben biológiai célokra is fel kívánom használni ezeket a távtartókat, ezért szükséges volt tudnom, hogy mutatnak-e citotoxikus tulajdonságot. A citotoxicitási vizsgálatokat humán PBMC sejteken terveztem végrehajtani.

III.)

A biotin tartalmú peptidkonjugátumokat többféleképpen terveztem előállítani. A szilárd fázison előállított tesztpeptidekhez a bevált kapcsolóreagensek segítségével a védett aminosav-típusú oligoetilénglikol távtartókat egy lépésben kapcsolhatom. Mivel aminosav-típusú távtartókat használtunk, ez lehetőséget biztosít arra, hogy egymás után több távtartót kapcsoljak egymáshoz. Célom volt tovább, hogy megvizsgáljam, hogy lehetséges-e 2 illetve 3 távtartó egymáshoz kapcsolása, és milyen változást okoz beépítésük a létrejött peptidkonjugátum oldhatóságában. A tervem továbbá egy másik szintézisút megvalósítása, amelyben szilárd fázison építem fel a biotinnal módosított oligoetilénglikol alapú távtartókat, majd az így felépített biotinilált-oligoetilénglikolt a gyantáról lehasítva egy lépésben kapcsolom a vizsgálandó peptidhez. A konjugátumok oldhatóságának mérését HPLC-készüléken, illetve tömegmérésen alapuló eljárást kívántam felhasználni.

4. Eredmények

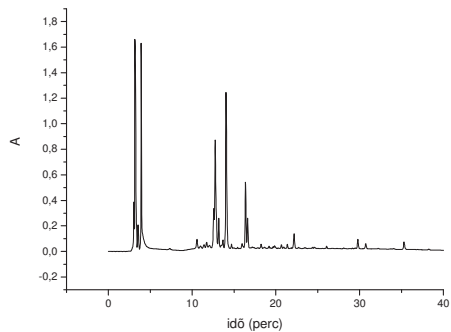
4.1. A CP és VP peptidek szintézisének eredményei

A H-C(Acm)VVVVDVSHEDP-NH₂ (CP) és H-VVDVSHEDP-NH₂ (VP) peptidek szintézisét kétféle stratégiával hajtottam végre:

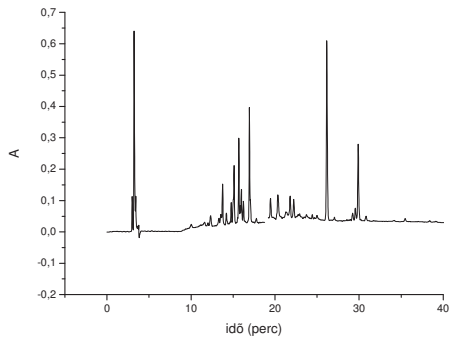
A Boc/Bzl stratégiával való szintézishez MBHA gyantát használtam. Az első aminosav (prolin) kapcsolása előtt a gyantát diizopropil-etilaminnal kezeltem az aminosav hidroklorid sójából történő felszabadítása végett. A kapcsolásokat 3 ekvivalens DIC/HOBT kapcsolóreagensekkel végeztem. A kapcsolások sikerességét Kaiser-tesztel ellenőriztem, két színreakció esetén újrapcsolást alkalmaztam PyBOP/HOBT kapcsolóreagensekkel. A második (prolin utáni) aminosav (Asp) kapcsolásának sikerességét izatin próbával ellenőriztem. A peptid valinban gazdag részeinél a ninhidrin teszt eredményétől függetlenül minden esetben újrapcsolást alkalmaztam. A Boc védőcsoportot 33%-os TFA/DCM eleggyel távolítottam el. A peptid gyantáról való hasítása folyékony hidrogénfluoriddal történt *p*-krezol gyökfogó jelenlétében.

Az Fmoc/tBu stratégiával való szintézishez Rink-amid-MBHA gyantát alkalmaztam. A peptideket Syro 2000 automata peptidszintetizátorral készítettem el. A szintetizátort úgy programoztam be, hogy a kapcsolásokhoz kizárólag DIC/HOBT kapcsolóreagenseket használjon, azonban minden kapcsolást megismételt, valamint a kapcsolások alatt rázogatással homogenizálja a reakcióelegyet. Az Fmoc védőcsoport eltávolítása piperidin/DMF eleggyel történt. A peptid gyantáról való hasítását TFA-víz eleggyel végeztem 1,2-etánditiol mellett. A hasítás után minden esetben a nyers peptidet éter hozzáadásával izoláltam, majd RP-HPLC-n tisztítottam. Az előállított peptideket tömegspektrometriával (MS) és aminosavanalízissel (AAA) azonosítottuk, valamint nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával vizsgáltam homogenitásukat (2. táblázat).

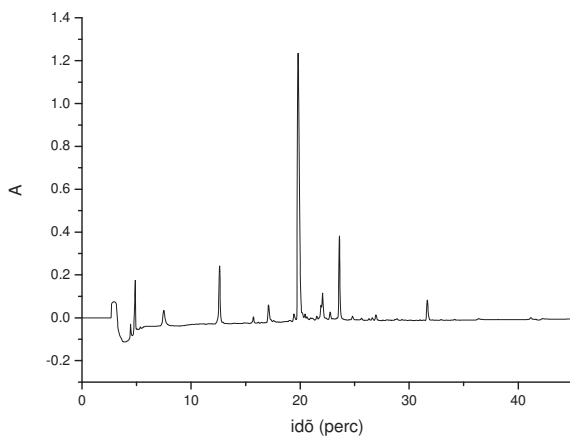
Tapasztalatként megállapítottam, hogy Boc/Bzl stratégiával történt szintézisnél folyamatos ninhidrin-tesztelés és újrapcsolás ellenére Ser-, illetve His-hiányos szekvenciájú peptideket is kaptam melléktermékként, amelyek megnehezítették a tisztítást (10., 11. ábra). Az automata peptidszintetizátorban, Fmoc/tBu stratégiával szintetizált peptidek (12., 13. ábra) homogenitása sokkal jobb volt.



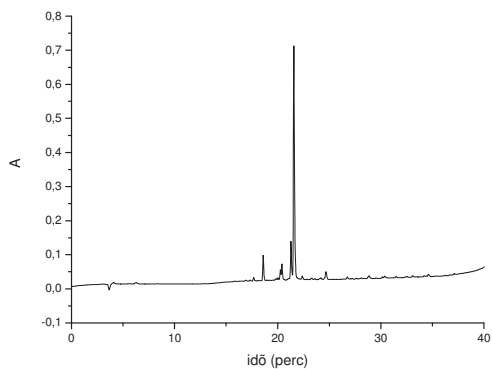
10. ábra: Boc stratégiával előállított nyers VP peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja



11. ábra: Boc stratégiával előállított nyers CP peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja



12. ábra: Fmoc stratégiával előállított nyers VP peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja



13. ábra: Fmoc stratégiával előállított nyers CP peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja

4.2. Az ED peptid szintézisének eredményei

Az H-EVTC(Acm)VVVD-NH₂ (ED) modellpeptid szintézisét az eddigi tapasztalatok alapján Fmoc/tBu stratégiával hajtottam végre. A CP és VP peptidek előállításához hasonlóan az ED peptid is valin gazdag részt tartalmaz, aggregálódásra hajlamos. A szintézishez 0,65 mmol/g kapacitású Rink-amid-MBHA gyantát alkalmaztam. A peptideket Syro 2000 automata peptidszintetizátorral készítettem el. A szintetizátort ennek a peptidnek előállításához is úgy programoztam be, hogy a kapcsolásokhoz DIC/HOBT kapcsolóreagenseket használjon 4 ekvivalens feleslegben. Az általam készített protokoll szerint minden kapcsolást megismételt, valamint a kapcsolások alatt rázogattással homogenizálja a reakcióelegyet. Az Fmoc védőcsoport eltávolítása piperidin/DMF eleggyel történt. A peptid gyantáról való hasítását TFA-víz eleggyel végeztem 1,2-etánditiol mellett.

A hasítás után a nyers peptidet éter hozzáadásával izoláltam, majd RP-HPLC-n tisztítottam.

Az előállított peptideket tömegspektrometriával (MS) és aminosavanalízissel (AAA) azonosítottam, valamint nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával vizsgáltam homogenitásukat (2. táblázat).

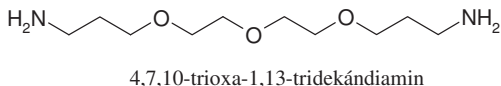
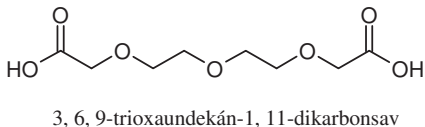
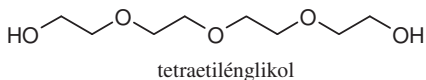
2. táblázat: Az előállított peptidek analitikai jellemzése

termék	szekvencia	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért	aminosav összetétel mért (számított)
CP	H-C(Acm)VVVDVSHEDP-NH ₂	21,4	1268,4	1268,6	D:2,01 (2); S: 1,06 (1); E:1,25 (1); P: 1,44 (1); C: 0,57 (1); V: 3,49 (3); H: 1,03 (1)
VP	H-VVDVSHEDP-NH ₂	18,4	995,1	995,8	D:2,06 (2); S: 1,06 (1); E:1,35 (1); P: 0,65 (1); V: 2,57 (3); H: 1,12 (1)
ED	H-EVTC(Acm)VVVD-NH ₂	17,4	933,1	933,6	D:1,02 (2); T:0,78 (1); E:1,37 (1); C: 0,74 (1); V: 3,89 (4)

4.3. Oligoetilénglikol származékok

Oligoetilénglikol származékok alkalmazása a peptidszintézisben elősegíti hidrofób peptidek oldhatóságának növekedését. Fontos szempont emellett, hogy molekulatömege pontos, jól definiált legyen, ne tartalmazzon polimerizációs melléktermékeket. Ezért olyan funkció csoporttal ellátott oligoetilénglikol származékokat kellett előállítanom, amelyek a peptidkémiai használat során a peptidkémiai leginkább használt Boc-, illetve Fmoc-csoporttal védtem, hogy a peptidszintézis során a keletkező polimerizációs melléktermékek képződését meggátoljuk. A célmolekulám tehát egy olyan távtartó szerepét töltené be, amely tartalmaz karboxilcsoportot, hogy peptidek *N*-terminálisához kapcsolható legyen amidkötéssel, valamint egy védett aminocsoportot, hogy további molekulákat (esetünkben biotint) kapcsoljunk hozzá a védőcsoport eltávolítása után.

Doktori munkám során két alapvegyületet használtam fel, a tetraetilénglikol oxidált formáját a 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsavat (TEG), valamint a 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamint (TTD) (8.ábra).

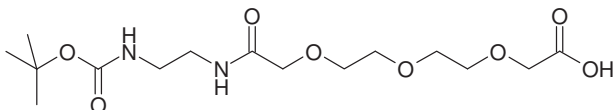


8.ábra: A kiindulási oligoetilénglikolok

4.3.1. 3, 6, 9-trioxaundekán-1, 11-dikarbonsav (TEG) alapú távtartók

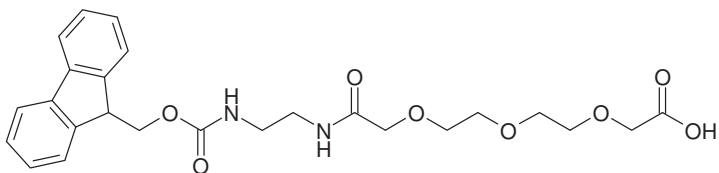
Dikarbonsav alapú távtartó szintéziséhez a választott alapvegyület a tetraetilénglikol volt. A tetraetilénglikol egy kétértékű alkohol, amely négy etilénglikol egységből épül fel. Vízen nagyon jól oldódik.

A tetraetilénglikol hidroxilcsoportjait kálium-permanganát segítségével karbonsavvá oxidáltam (51). A kapott dikarbonsav alkalmas további felhasználásra peptidszintézisben. Azonban, hogy lépésenkénti szintézisben használható legyen, egy védett aminoterminálist hoztam létre. Kézenfekvő megoldásként egy védett diamin vegyülettel reagáltattam, amellyel amidkötést kialakítva létrehoztam egy védett *N*-, illetve *C*- terminálissal rendelkező (aminosav-típusú) távtartó molekulát. Boc-csoporttal védett 1,2-etiléndiamint (EDA) (52) felhasználva dikarbonsav alapú Boc-védett távtartót (Boc-EDA-TEG) állítottam elő (14. ábra).



14. ábra: Boc-EDA-TEG távtartó szerkezete

Hasonló eljárással Fmoc védett 1,2-etiléndiaminnal Fmoc védett dikarbonsav alapú távtartót állítottam elő (15. ábra).



15. ábra: Fmoc-EDA-TEG távtartó szerkezete

4.3.1.1. Tetraetilénglikol oxidálása

A Boc-EDA-TEG távtartó előállításához először a kiindulási vegyületet, a tetraetilénglikolt kellett dikarbonsavvá oxidálnom. Ehhez kálium-permanganátot használtam fel kétszeres moláris mennyiségben, hiszen a tetraetilénglikol kétértékű alkohol. Az oldószer víz volt, amiben feloldottam a kiindulási anyagot, valamint a bázisos körülmények létrehozásához szükséges kálium-hidroxidot. A reakció hevesen játszódik le, a reaktáns hozzáadása után a lombik felforrósodott, majd a mangándioxid barna színe gyorsan megjelent, amely jól jelzi a reakció előrehaladtát. A reakció feldolgozását nehezítette, hogy a termék kinyerése vízből nehéz, ezért az oldószer csökkentett nyomáson való eltávolítása után a reakcióelegyet Soxhlet-extrakciónak vettem alá. A Soxhlet extrakció (folyadék/szilárd) lényege, hogy a cellulózhüvelybe helyezett terméket a lecsapódó diklórmetán oldószergőz extrahálja, majd a termék oldat formájában a lombikba jut ahol koncentrációja az extrahálási folyamat során megnő. Ezzel a módszerrel a melléktermékek mellől ki tudtam nyerni a terméket.

4.3.1.2. Tetraetilénglikol heterogén fázisú oxidálása

Mivel a fentebb leírt módszer működőképesnek bizonyult tetraetilénglikol oxidációjára, de a termék izolálása körülményes, ezért egyszerűbb eljárást kerestem, mely segítségével a végtermék könnyebben kinyerhető.

A heterogén fázisú oxidáció nagy előnye, hogy a reagens (KMnO_4) és melléktermékként képződő (MnO_2) a reakcióelegyből könnyen eltávolítható, és az anyag egy csökkentett nyomású oldószer-eltávolítás után könnyen kinyerhető.

Az irodalom említést tesz szekunder alkoholok oxidációjáról heterogén fázisban (52), ahol a reakcióhoz szükséges vizet a kristályvíz tartalmú katalizátor szolgáltatja (53), de ezt az eljárást eddig nem alkalmazták etilénglikol származékok oxidációjára.

Szerves oldószerek közül a dimetilformamidot, kloroformot, diklórmetánt és dioxánt egyaránt kipróbáltam a reakció végrehajtásához, mert a tetraetilénglikol ezekben az oldószerekben jól oldódik. A reakció feldolgozása a fentebb említett homogén fázisú reakciónál egyszerűbb, hiszen a reaktáns kálium-permanganát, a mangándioxid, illetve a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ katalizátor nem oldódik fel a reakcióelegyen. Ezek kiszűrése után, valamint az oldószer csökkentett nyomáson való eltávolítása után a nyerstermék könnyen kinyerhető. A

felhasznált oldószerekkel végzett kísérletek eredményei a 3. táblázatban szerepelnek. Mivel a legmagasabb kitermelést dioxán esetén értem el, a továbbiakban ezt az oldószert alkalmaztam a szintézishez.

3. táblázat: Tetraetilénlikol heterogén fázisú oxidálásához felhasznált oldószerek és a hozzájuk tartozó kitermelések

oldószer	kitermelés
dimetilformamid	76%
kloroform	72%
diklórmétán	75%
dioxán	88%

4.3.1.3. 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav (TEG) aszimmetrikus védése

Az előállított 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav egy kétértékű karbonsav. A mellékreakciók elkerülése végett az egyik karboxilcsoportot védeni kell. A karbonsavak átmeneti védésének egyik leggyakrabban használt módja az észtercsoport kialakítása. A reakció kivitelezését nehezíti, hogy a két karboxil csoport egy szimmetrikus molekula két végén helyezkedik el, melyek megkülönböztethetetlenek. Az irodalom említést tesz alkil-dikarbonsavak aszimmetrikus átészterezéséről (54), ezért megvizsgáltam, hogy oligoetilénlikol-jellegű dikarbonsavak esetén is használható-e a módszer.

A reakció lényegében egy átésztereződés butilformiát segítségével. Az eljárásban egy nagy víztartalmú savas ioncserélő gyantát használtam katalizátorként. Az ioncserélő gyanta vizes közegében oldottam a kiindulási anyagot, majd reflux (80 °C) hőmérsékleten egy 1:1 V/V oktán/butilformiát elegyben reagáltattam.

A víztartalmú gyanta és az 1:1 V/V oktán/butilformiát elegy két fázist alkot. A reakció feltehetőleg a két fázis határfelületén játszódik le, ahol a kiindulási vegyület egyik karboxilcsoportja átésztereződik a butilformiáttal, majd ez a félészter átoldódik az oktán tartalmú szerves fázisba, és ebben az aprotikus közegben további észtereződésre már nem képes. A reakció folyamán a termék tehát a szerves fázisban dúsul fel.

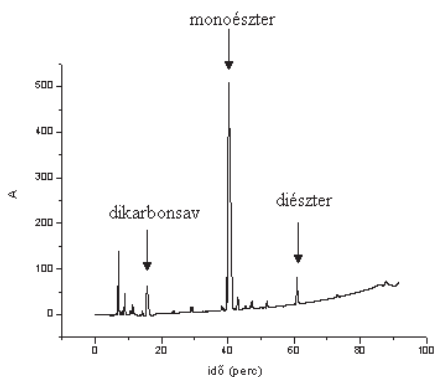
A reakció után a szerves fázis egyszerűen eltávolítható a katalizátortól, és az oldószer eltávolítása után megkaptam a nyers terméket, esetünkben a 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav monobutíleszterét (TEG-OBu).

A reakció tehát kitűnően alkalmazható oligoetilénlikolok savszármazékainak aszimmetrikus védéséhez. Többféle oldószerkeletet is kipróbáltam az irodalomban leírt mellett. A felhasznált oldószerek és a kapott termék/melléktermék arányt a 4. táblázatban tüntettem fel

4. táblázat: TEG-OBu előállításához felhasznált oldószerkelet és a hozzájuk tartozó kitermelések

reaktáns	oldószer	konverzió	monoészter	diészter
metilformiát	oktán	40%	61%	39%
etilformiát	oktán	42%	55%	65%
metilacetát	oktán	66%	64%	46%
etilacetát	oktán	30%	76%	34%
propilacetát	oktán	52%	78%	32%
butilformiát	oktán	90%	95%	5%

A kísérleti adatokból látszik, hogy más oldószerkelettel szemben az oktán/butilformiát elegy adja a legjobb kitermelést 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav aszimmetrikus észterezésénél. A nyers termék HPLC kromatogramján (16. ábra) látható, hogy csak kis százalékban képződött dibutyl-észter.



16. ábra: A nyers TEG-OBu HPLC kromatogramja

4.3.1.4. Mono-Boc-1,2-etiléndiamin (Boc-EDA) és mono-Fmoc-1,2-etiléndiamin (Fmoc-EDA) előállítása

A 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav alapú távtartó előállításához szükségünk van aszimmetrikus, csak az egyik aminosoportjukon védett Boc-, illetve Fmoc-alkil-diamin származékokra.

Védett 1,2-etiléndiamin alkalmazása azért célszerű, mert könnyen kapcsolható a tetraetilénglikol-dikarbonsav félészterének szabad karboxil-csoportjához savamidkötéssel, így aminosav-típusú karbonsav alapú távtartót tudunk létrehozni.

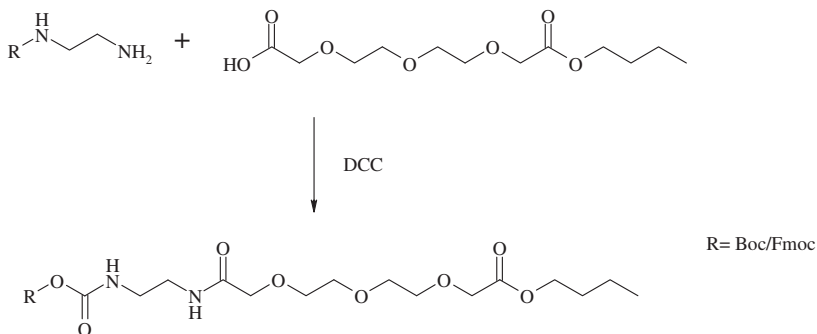
Az 1,2-etiléndiamin (EDA) Boc csoporttal való védelme az irodalomban leírt reakciók alapján könnyen véghezvihető (55). Az egyik módja, hogy az 1,2-etiléndiamin nagy feleslegéhez ditercbutiloxi-dikarbonát oldatát adjuk, ahol a kis mennyiségben melléktermékként keletkező diBoc-1,2-etiléndiamin mellett kapjuk meg a mono-Boc védett 1,2-etiléndiamint. A másik módja, hogy $Mg(OH)_2$ segítségével az 1,2-etiléndiaminból Mg-komplexet képzünk, amelyben egy-egy 1,2-etiléndiamin aminosoportja koordinálódik a magnéziumionhoz, így biztosítva az aminosoport átmeneti védelmét a reakció során (56).

A termék feldolgozását vákuumdesztillációval hajtottam végre, és a keletkező terméket, amely szintelen olaj, könnyen elválaszthattam a melléktermékektől.

Az 1,2-etiléndiamin Fmoc védelme közvetlenül nem lehetséges. Mivel az Fmoc csoport szerves bázisokra érzékeny – peptidszintézisben az Fmoc csoportot piperidinnel hasítják – az 1,2-etiléndiamin bázisként viselkedve azonnal bontja a létrejött Fmoc védelmet. Az Fmoc védett 1,2-etiléndiamin előállítása tehát kerülőúttal lehetséges (55). A fent leírt mono-Boc-1,2-etiléndiamin szabad aminosoportját már tudtam Fmoc csoporttal védeni, és az így létrejövő Boc-EDA-Fmoc köztermékről a savérzékeny Boc csoportot sósavas dioxánnal eltávolítottam, így megkaptam az Fmoc védett 1,2-etiléndiamin hidroklorid sóját.

4.3.1.5. Védett EDA-TEG alapú távtartók szintézise oldatban

A TEG alapú távtartó elemeit – a védőcsoporttal ellátott 1,2-etiléndiamin és a TEG-OBu – amidkötéssel egymáshoz kapcsoltam, melléktermékek képződése nélkül. A Boc és Fmoc védett távtartókat (Boc-EDA-TEG és Fmoc-EDA-TEG) oldatban hasonló eljárással állítottam elő. A reakcióhoz ideális oldószer a diklórmétán, amelyben az összes kiindulási anyag és reaktáns jól oldódik. *N,N'*-diciklohexil-karbodiimiddel (DCC) az amin és sav komponens között egyértelmű amidkötést tudtam létrehozni, polimer jellegű melléktermékek képződése nélkül (17. ábra).



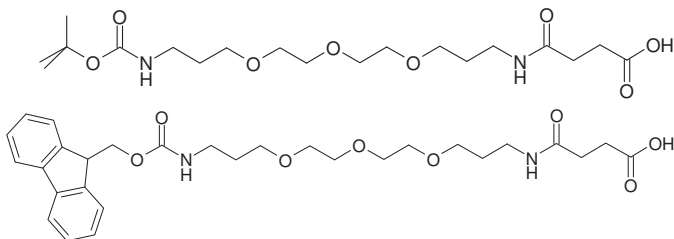
17. ábra: Védett EDA és TEG-OBu kapcsolása DCC-vel

A létrejött köztitermék azonban még tartalmazza a karboxilcsoport átmeneti butilészter védelmét. A reaktánsból képződött urea származék eltávolítása után a köztitermékéről lúgos hidrolízissel eltávolítottam a butil védőcsoportot anélkül, hogy az amino védőcsoportot lehasítottam volna. A Boc védőcsoport ugyanis erős savakra, az Fmoc védőcsoport pedig szerves bázisokra érzékeny. A termékeket a további felhasználás előtt RP-HPLC-vel tisztítottam.

4.3.2. 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin (TTD) alapú távtartók

Az előző fejezetben leírt 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav segítségével előállított távtartók mellett kerestem egy másik lehetőséget, hogyan lehet más módon, egyszerűbben előállítani védett oligoetilénlikol alapú távtartókat. Így dikarbonsav helyett egy diamin típusú oligoetilénlikolból indultam ki. Az irodalom említést tesz ilyen diamin távtartók előállításáról (57), kipróbáltam, hogy 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin és borostyánkősav esetében működik-e az eljárás.

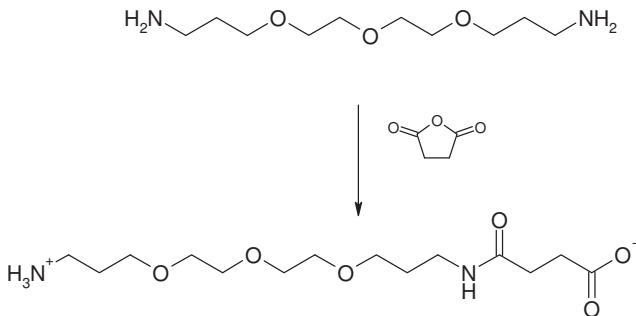
A 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin egy kereskedelmi forgalomban kapható oligoetilénlikol származék, melyet szintén aminosav-típusú – tehát amino és karboxilcsoporttal rendelkező – vegyületté alakítottam át. Mivel a kiindulási vegyület rendelkezik aminocsoporttal, így a karboxilcsoport létrehozása a feladatom. Erre a célra borostyánkősavanhidridet használtam. A kapott távtartó aminocsoportját Boc, illetve Fmoc védelemmel láttam el (18. ábra).



18. ábra: Boc- és Fmoc-védett távtartó szerkezete

4.3.2.1. Ikerionos szerkezet létrehozása

A 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin alapú távtartó szintézisének fontos előrelépést jelentett, hogy a távtartó építőelemeinek átmeneti védelmét el tudtam kerülni. A 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin kiindulási vegyületet borostyánkősavanhidriddel reagáltatva ikerionos szerkezetet hoztam létre. A borostyánkősavanhidrid egy gyűrűs anhidrid, amely aminocsoporttal gyorsan reagál, amidkötést hozva létre. A gyűrű felnyílása után a másik karboxilcsoporttal anionos szerkezetet hoz létre (19. ábra). Mivel az aminocsoportot nem védjük le, elvben lehetőség nyílik arra, hogy többszörösen acilezett terméket kapjunk. Azonban az amidkötés létrejöttékor kialakuló ikerionos szerkezet az oldószertől függően kicsapódik a reakcióelegyből. Szerves oldószert használva a TTD-Su ikerion kicsapódik az oldatból, külön fázist képez az oldatban lévő kiindulási anyagoktól, ezért további acileződésre nem lesz képes. A reakció pillanatszerű, és az ikerion olajként kiválik. Így egységes, jól jellemezhető terméket kaptam, és szükségtelenné válik az építőelemek átmeneti védelme. Több szerves oldószert próbáltam ki, hogy megvizsgáljam melyik közegben a legnagyobb a kitermelés. Az 5. táblázatban foglaltam össze az eredményeket. Tapasztalként megállapítottam, hogy az ikerion kinyerésére leginkább alkalmas oldószér az acetonitril és az etilacetát.

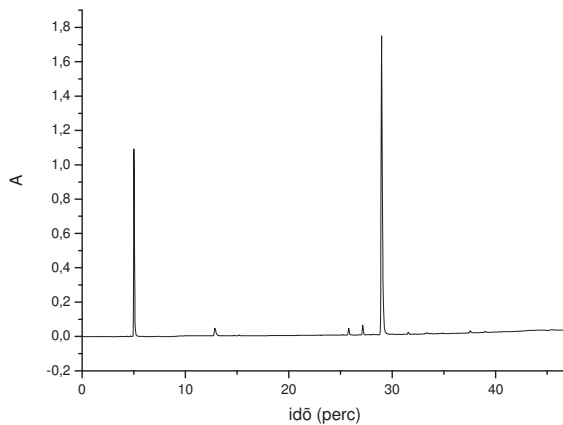


19. ábra: Az ikerionos szerkezetű TTD-Su létrehozása

5. táblázat: TTD-Su ikerion kitermelése oldószerek függvényében

oldószer	kitermelés
etilacetát	95%
acetonitril	90%
dimetilformamid	87%
diklórmétán	80%
dioxán	60%
tetrahidrofurán	55%

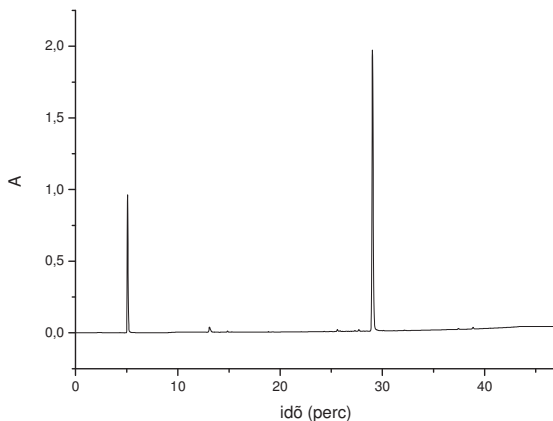
A nyerstermék analitikai RP-HPLC kromatogramján látható, hogy a termék további tisztítást nem igényel (20. ábra).



20. ábra: A nyers TTD-Su HPLC kromatogramja

4.3.2.2. Boc és Fmoc védelem kialakítása TTD-Su távtartón

A fentebb leírt reakcióban képződött ikerionos szerkezetű TTD-Su vegyület védeése Boc és Fmoc csoporttal hasonló körülmények között játszódik le. Mivel az ikerion nem oldódik a szerves oldószerek többségében, ezért aceton-víz vagy dioxán-víz oldószerkelegyen hajtjuk végre a védőcsoport beépítését. A védelem kialakítása mellett fontos tényező, hogy az aminocsoport mindenképpen amin formában szerepeljen a reakcióban, és nem sóként, ezért megfelelő mennyiségű bázis – NaHCO_3 , vagy diizopropil-etilamin (DIEA) – mellett az ikeriont vízben oldottam fel. A védőcsoportok kialakítását Boc_2O , illetve FmocOSu felhasználásával értem el. A védőcsoportot kialakító reaktáns vízzel elegendő szerves oldószerben kell oldani, Boc védelemnél célszerű dioxánban, Fmoc védelemnél acetonban. Az így létrejövő oldószerkelegyen az aminocsoport védelme pár óra alatt megtörténik. A reakció feldolgozása során mindössze a szerves oldószer csökkentett nyomáson való lepárlását, és egy bázikus extrakciós lépést kell végrehajtanunk. A bázikus folyadék-folyadék extrakció során a termék karboxilát sója a vizes fázisban marad, míg a szerves szennyezők és az el nem reagált reaktánsok a szerves fázisba (például etilacetát) vándorolnak. A vizes fázist elválasztása után sósavval savanyítva, a termék már karbonsav formában újra extrahálható szerves fázisba, amelyből szárítás, majd bepárlás után megkapjuk a terméket, amelyet további tisztítási lépések nélkül felhasználhatunk. A Boc, illetve Fmoc védett 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin-borostyánkősavat egyaránt olaj formájában kaptam meg. A reakció teljesen egyértelműen játszódik le, melléktermékek képződése nélkül, valamint az extrakciós lépéseken keresztül a termék mellől az el nem reagált reaktáns eltávolítható, a nyerstermék további tisztítás nélkül használtam fel. A nyerstermék analitikai RP-HPLC kromatogramja 21. ábrán látható.



21. ábra: A nyers Fmoc-TTD-Su HPLC kromatogramja

4.3.2.3. Aktív észter kialakítása

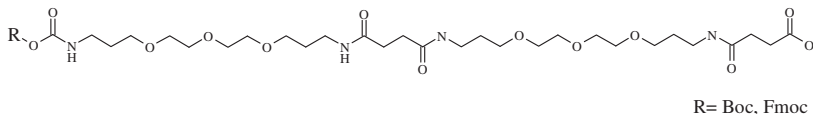
Peptidszintézisben kapcsoláskor széles körben használják az aminosavak aktivált észtereit, melyek általában stabil, kristályos vegyületek. Különösen az elektronvonzó csoportokkal szubsztituált fenilészterek az elterjedtek, azok közül is a pentaklór-fenil-észter (OPcp). A védett TTD alapú távtartók esetében szintén célszerű aktivált észterük előállítását, hiszen így egyszerűen, egy lépésben, kapcsolóreagensek nélkül reagáltatható peptidekkel, vagy szabad aminosocsoporttal rendelkező távtartókkal.

A védett TTD-Su-t diklórmétánban *N,N'*-diciklohexil-karbodiimiddel reagáltatva megkapjuk az előaktivált köztiterméket. Az aktivált köztitermék és a pentaklórfenol reakciója során képződik a kiindulási anyag pentaklórfenilésztere.

A képződő rosszul oldódó diciklohexilurea eltávolítása után az el nem reagált kiindulási anyagtól éteres eldörzsöléssel szabadult meg.

4.3.2.4. TTD alapú távtartók összekapcsolása

A védett TTD-Su távtartók aktív pentaklórfenol észtere kitűnő kiindulási vegyület hosszabb oligoetilénlikol távtartók előállításához. A védett TTD alapú távtartó aktív észterét (Boc-, illetve Fmoc-TTD-Su-OPcp) nem védett TTD-Su-val reagáltattam, így amid kötés létrehozásával egy kétszer olyan hosszú, védett oligoetilénlikol távtartót kaptam (22. ábra).



22. ábra: Védett (TTD-Su)₂ távtartó szerkezete

Két TTD-Su alapú távtartó összekapcsolását szilárd fázison és oldatban egyaránt végrehajtottam.

Az oldatban végzett szintézisek esetén célszerű dioxánt vagy tetrahydrofuránt használni, mert ezekbe az oldószerekbe az ikerion képes beoldódni. Mivel külön kapcsolóreagenseket nem kell használnom, az aktivált és szabad távtartót csak egyesítettem és keverttem. A reakcióelegy feldolgozását a védett-TTD-Su előállításával megegyezően hajtottam végre.

Szilárd fázison nem szükséges pentaklórfenilésztert használni, mert a peptidkémiaiában használatos kapcsolóreagensekkel is végrehajtható a reakció. Szilárd hordozóhoz az aminosavaknál már megismert eljárással hozzákapcsoltam a védett TTD-Su távtartót. A védőcsoport eltávolítása után egy újabb védett TTD-Su-t kapcsoltam a már gyantán lévőhöz. Mivel az elsőként kapcsolt TTD-Su karboxilcsoportja a gyantához van kötve, így a védett TTD-Su kapcsolása DIC/HOBt, vagy PyBOP/HOBt kapcsolóreagensekkel nem okozott mellékreakciókat. Tapasztalataim alapján azonban az oligoetilénlikol láncok a gyantán egymáshoz aggregálódhatnak, ezért célszerű a kapcsolóelegybe DMSO-t tenni. A szilárd fázisú szintézis lehetőséget ad arra, hogy ezekből a távtartókból egymás után többet is összekapcsoljunk.

4.4. Biotin csoport beépítése (biotinilálás)

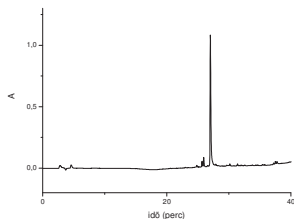
Peptidek biotinnal való jelölésére az irodalomban számos példát találunk (58, 59). A biotint általában a szintetizált peptid *N*-terminális aminosavának α -aminocsoportjához kapcsolják a peptidkémiaiában használatos kapcsolóreagensek segítségével. A biotin, amely karboxilcsoporttal rendelkezik, aktív észter formájában kötik az aminocsoporthoz. A biotin azonban rossz oldhatósággal rendelkezik a peptidkémiaiában használatos oldószerekben (dimetilformamid, diklórmétán), ami megnehezíti a reakcióelegyek előállítását.

A kereskedelmi forgalomban kaphatóak aktivált biotin származékok, például a biotinil-6-aminohexánsav *N*-hidroxiszukcinimid észtere, azonban ez az aktív észter lassan reagál. A biotin rosszul oldódik szerves oldószerekben, így a kapcsoláshoz általában használt dimetilformamidban is. Általában PyBOP/HOBt kapcsolóreagensek használata ajánlott, mivel így nagyobb kitermelést lehet elérni, mint például DIC/HOBt kapcsolóreagensek segítségével. Ha egy edényben végezzük a biotin és a kapcsolóreagensek oldását, az esetek nagy részében kétfázisú, vagy kolloid oldatot kapunk. Az általam alkalmazott biotiniláló kapcsolóreagely előkészítése megkönnyíti biotinszármazékok kapcsolását. A biotint, illetve a biotinil-6-aminohexánsavat dimetilszulfoxidban (DMSO) bázis jelenlétében (DIEA) szuszpendáltam. Egy másik edényben, a további kapcsolóreagenseket – a PyBOP-ot, valamint a HOBt-t – egy másik reakcióedényben dimetilformamidban oldottam fel. Miután a szuszpenziót és az oldatot egyesítettem, a biotin vagy biotinil-6-aminohexánsav szuszpenzió kitisztul, és így tiszta oldatot kapunk, amelyet aminocsoportot tartalmazó gyantához adva a biotinnal való jelölés általában 2 órán belül lezajlik. Ez a módszer jelentősen megkönnyíti a biotinilálást, hiszen így lehetőség van tömény kapcsolóelegyet létrehozni, nincs szükség további oldószer hozzáadásához az oldódás növelése érdekében.

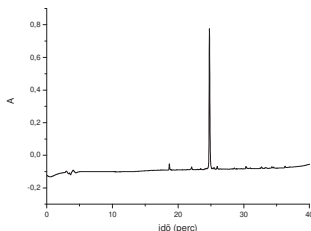
4.4.1. Biotinilált peptidek

Az általam szintetizált peptidek biotinilált változatait szilárd fázison állítottam elő. Az *N*-terminális aminosav (CP esetén cisztein, VP esetében valin, ED esetében glutaminsav) védőcsoportját lehasítottam. A biotin, illetve biotin-6-aminohexánsav aktiválását PyBOP/HOBt kapcsolóreagensekkel a fent leírt módon végeztem, majd a kapcsolóelegyet a gyantához adtam. A biotinilálás után a kapcsolás sikerességét ninhidrin próbával igazoltam. Az Fmoc védőcsoport eltávolítása piperidin/DMF eleggyel történt. A biotinilált peptid gyantáról való hasítását TFA-víz eleggyel végeztem 1,2-etánditiol mellett. A hasítás után minden esetben a nyers biotinilált peptidet éter hozzáadásával izoláltam, majd RP-HPLC-n tisztítottam.

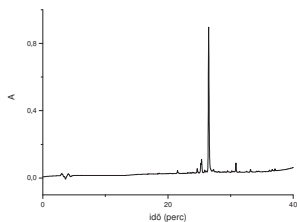
Az előállított peptideket tömegspektrometriával (MS) és aminosavanalízissel (AAA) azonosítottuk, valamint nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával vizsgáltam homogenitásukat (6. táblázat). A biotinilált CP és VP peptidek kromatogramjai, a 24., 25. ábrán, a biotin-6-aminohexánsavas peptidek kromatogramjai a 26., 27. ábrán láthatók.



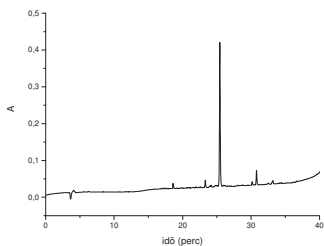
24. ábra: A biotinilált CP peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja



25. ábra: A biotinilált VP peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja



26. ábra: A biotin-6-aminohexánsav tartalmú CP peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja



27. ábra: A biotin-6-aminohexánsav tartalmú VP peptid analitikai RP-HPLC kromatogramja

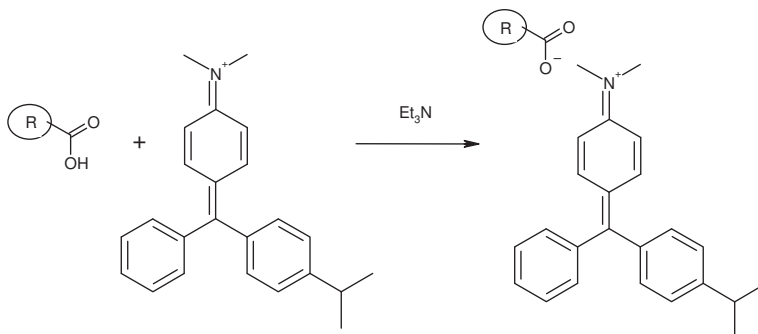
6. táblázat: A biotinilált peptidek analitikai jellemzése

termék	t_{Ret}	$[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt	$[\text{M}+\text{H}]^+$ mért
biotinil-CP	27,3	1494,7	1494,4
biotinil-VP	24,7	1221,4	1221,6
biotinil-ED	26,4	1159,4	1159,6
biotin-6-aminohexánsavamid-CP	26,6	1607,8	1607,1
biotin-6-aminohexánsavamid-VP	25,5	1334,5	1334,4
biotin-6-aminohexánsavamid-ED	30,5	1272,6	1272,7

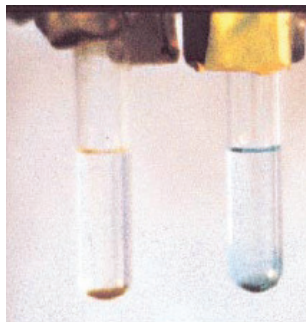
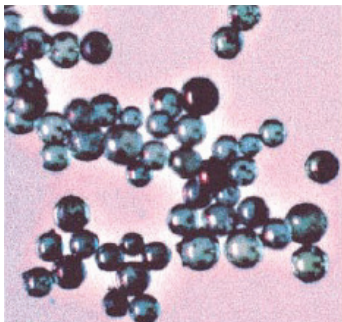
4.4.2. Biotinilált TEG alapú távtartó szintézise szilárd fázison

A biotinilált TEG alapú távtartót (biotin-EDA-TEG) előállítottam szilárd fázison is, lépésenkénti szintézissel.

Első lépésben a TEG-OBu szabad karboxilcsoportját kapcsoltam a gyantához. Itt az észtervédelemre a keresztkötések elkerülése miatt van szükség. Az észterkötés hasítását a gyantáról 1M NaOH – dimetilformamid 2:8 (V/V) arányú elegyével végeztem. A dimetilformamidra azért van szükség, mert a gyantaszemcsék vizes oldatokban rosszul duzzadnak, így az aktív helyek hozzáférhetetlenné válnak. Az észtercsoport eltávolítása után szabad karboxilcsoportot kaptam. Ez megfelel egy 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsavnak, melynek egyik karboxilcsoportja szilárd hordozóhoz van kötve. A butilészter eltávolításának sikerességét Malachit-zöld indikátor segítségével ellenőriztem. A Malachit-zöld indikátor karboxilcsoporttal reagálva színes söt képez (60), amely ezáltal a gyantaszemcséket is zöld színűre festi (28., 29. ábra).



28. ábra: A Malachit-zöld indikátor reakciója karboxilcsoporttal



29. ábra. A Malachit-zöld indikátor színreakciója gyantaszemcsékkel

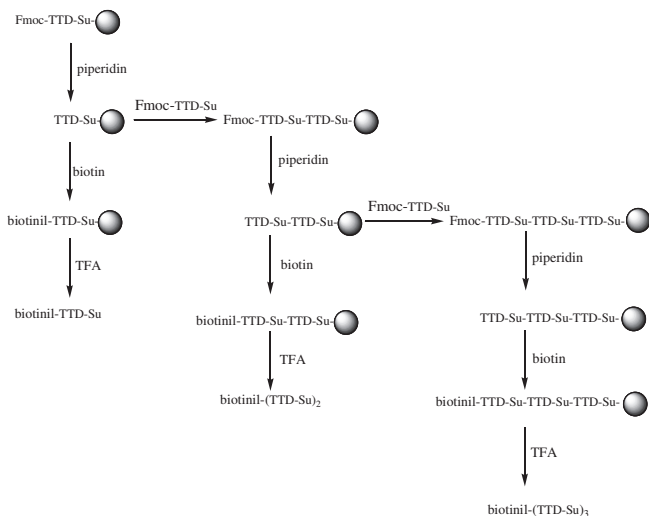
A gyantán lévő szabad karboxilcsoportot a peptidkémiai használatos kapcsolóreagensek (például DIC/HOBt) segítségével aktiválni tudjuk, így a védett 1,2-etiléndiamint hozzákapcsolhatjuk. A kapcsolat sikerességét szintén Malachit-zöld próbával tudjuk ellenőrizni, hiszen sikeres kapcsolat esetén a gyantaszemcsék ismét színtelenek lesznek. A Malachit-zöld indikátor így kettős szerephez jut a reakció során. Egyrészt az átmeneti butil-észter védőcsoport hasítása után ad információt az észterhidrolízis sikerességéről, másrészt az amidkötés kialakítása után tudjuk megvizsgálni a kapcsolat sikerességét. A védett 1,2-etiléndiamin felkapcsolása után, a védőcsoportot eltávolítva a szabad aminocsoportot biotiniláltam PyBOP/HOBt kapcsolóreagensek segítségével. Így a gyantáról való hasítás után TEG alapú biotin-változatot (biotin-EDA-TEG) kaptam.

Boc, illetve Fmoc védett 1,2-etiléndiamin használata során természetesen különböző szilárd hordozókat használtam. Boc-1,2-etiléndiamin esetén Merrifield gyantát, Fmoc technika esetén Wang gyantát használtam. A hasítás körülményei eltérőek; Merrifield gyanta használata esetén folyékony hidrogénfluoridot (HF), Wang gyanta esetén trifluoecetsav (TFA)-víz elegyet használtam. A nyerterméket mindkét stratégia esetén liofilizáltam, majd HPLC-vel tisztítottam, illetve tömegspektrometriával azonosítottam.

4.4.3. Biotinilált TTD alapú távtartók szintézise szilárd fázison

Biotinilált TTD alapú távtartók (biotin-(TTD-Su)_n, n=1,2,3) szintézise szilárd fázison igen hasonlós a peptidszintézishez. A megfelelő szilárd hordozóhoz az aminosavaknál már megismert eljárással kapcsoltam a védett TTD-Su távtartót. A védőcsoport eltávolítása után egy újabb védett TTD-Su-t kapcsoltam a már gyantán levőhöz DIC/HOBt, vagy PyBOP/HOBt kapcsolóanyagokkal. Tapasztalataim alapján ebben az esetben is érdemes a kapcsolóanyagba 5% DMSO-t tenni az aggregálódás elkerülése érdekében. Ezekből a biotinil-oligoetilénglikolokból olyan vegyületsorozatot állítottam elő, amelyek 1, 2, illetve 3 TTD-Su egységet tartalmaznak. A biotinilálás a fentebb leírt módszerrel történt. A hasítás módszere a biotinilált, illetve szabad peptidek hasításával megegyezik.

Az előállított biotinil-TTD-Su, biotinil-(TTD-Su)₂, biotinil-(TTD-Su)₃, biotinil-oligoetilénglikolok homogenitását analitikai RP-HPLC-vel vizsgáltam. A termékeket félpreparatív RP-HPLC-oszlopon tisztítottam. A biotinil-(TTD-Su)_n termékek gyantáról való hasítását TFA-víz eleggyel végeztem. A hasítás után minden esetben a nyers peptidet éter hozzáadásával izoláltam, majd RP-HPLC-n tisztítottam, tömegspektrometriával azonosítottam (7. táblázat).



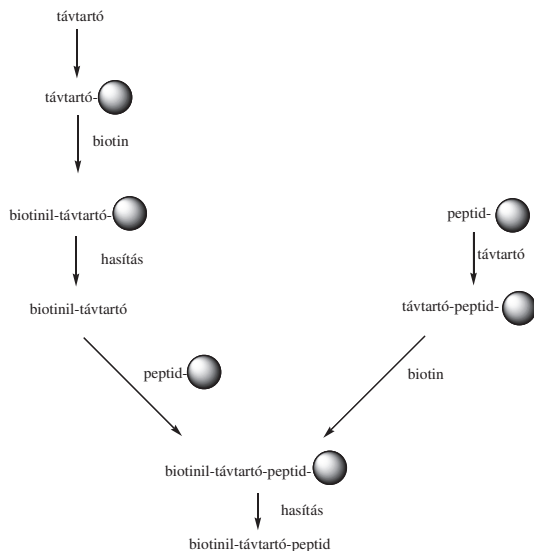
30. ábra: A biotinil-(TTD-Su)_n biotinilált távtartók előállítása Wang gyantán

7. táblázat: A biotin-(TTD-Su)_n konjugátumok analitikai jellemzése

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
biotin-TTD-Su	C ₂₄ H ₄₂ N ₄ O ₈ S	21,31	547,7	547,5
biotin-(TTD-Su) ₂	C ₃₈ H ₆₈ N ₆ O ₁₃ S	21,50	849,1	849,6
biotin-(TTD-Su) ₃	C ₅₂ H ₉₄ N ₈ O ₁₈ S	22,93	1151,4	1151,5

4.5. Biotinilált oligoetilénglikol peptidkonjugátumok

Több módon állítottam elő biotin és a peptid között oligoetilénglikol távtartót tartalmazó konjugátumokat. Mivel a távtartókat védőcsoporttal láttam el, ezért a távtartó kapcsolását és a biotinilálását egyaránt végrehajtottam szilárd hordozón, és közvetlenül a szintetizálódó célpeptid *N*-terminálisán. A két módszer vázlatos menetét a 31. ábra mutatja be.



31. ábra: A biotinil-oligoetilénglikol peptidkonjugátumok előállításának módszerei

Az első módszer esetében a biotinilált oligoetilénglikol távtartókat először szilárd fázison állítottam elő. A védett távtartót kötöttem a gyantához, majd a védőcsoport eltávolítása után biotint, vagy újabb távtartót kapcsoltam hozzá. Az így szintetizált biotin-oligoetilénglikolt a gyantáról való lehasítás után a vizsgálandó peptid *N*-terminálásához kapcsoltam.

A második módszer esetében, maga a biotinilált oligoetilénglikol távtartó szintézise a már kész peptidet tartalmazó gyantán történt, úgy hogy a védett távtartót a szintetizálódó peptid utolsóként beépített aminosavának *N*-terminálásához kapcsoltam, majd a védőcsoport eltávolítása után a szabad aminocsoportot biotiniláltam.

A két módszer használata azért fontos, mert könnyű, egyszerű, rövid szekvenciájú peptidek esetén nem szükséges külön szintetizálni a biotinil-oligoetilénglikolt, a szintézis történhet magán a peptiden, míg aggregálódásra hajlamos „nehéz” szekvenciák esetén – ahol az épülő peptidláncra már nehezen kapcsolhatók további építőelemek – célszerű az előre szintetizált biotin-oligoetilénglikolt egy lépésben kapcsolni.

A védett oligoetilénglikol távtartók további nagy előnye, hogy egymás után többször kapcsolhatjuk őket, hiszen védőcsoportjuk eltávolítása után, önmagukhoz újra kapcsolhatók. Így hosszabb távtartókat hozhatunk létre, amelyek több oligoetilénglikolt tartalmaznak, így jobban megnövelik extrém hidrofób peptidek, illetve konjugátumok vízoldhatóságát. Doktori munkám során mindkét módszert alkalmaztam.

A CP és VP peptidek esetében 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin alapú oligoetilénglikolból (TTD-Su) készítettem biotinilált konjugátumokat mindkét módszer segítségével. Az első esetben külön, előre elkészítettem a biotinil-(TTD-Su)_n (n=1,2,3) távtartókat. A TTD-Su elemek összekapcsolását DIC/HOBt kapcsolóreagensekkel végeztem, az Fmoc csoport eltávolítását 20% piperidin DMF-es oldatával távolítottam el. A biotinilált oligoetilénglikolokat TFA/víz eleggyel hasítottam le a gyantáról. Az ily módon előállított biotinil-(TTD-Su)_n (n=1,2,3) biotinilált oligoetilénglikolokat RP-HPLC-n tisztítottam, majd liofilizáltam. Ezután egy lépésben kapcsoltam a megfelelő tesztpeptid utolsó aminosavának *N*-terminálásához. A biotinil-(TTD-Su)_n-peptid konjugátumokat 1,2-etánditiolt tartalmazó TFA/víz elegy segítségével hasítottam le a gyantáról.

A másik esetben a peptidet tartalmazó gyantán az utolsó aminosav *N*-terminálásához kapcsoltam az Fmoc-TTD-Su oligoetilénglikol távtartót. Az Fmoc csoportot 20% piperidin DMF-es oldatával lehasítottam, majd újabb Fmoc-TTD-Su-t, illetve biotint kapcsoltam DIC/HOBt, illetve PyBOP/HOBt kapcsolóreagensek segítségével. A hasítás a gyantáról

szintén TFA/víz eleggyel 1,2-etánditiol jelenlétében történt. A termékeket RP-HPLC-vel tisztítottam és tömegspektrometriával azonosítottam.

A CP és VP tartalmú konjugátum előállításakor megállapítottam, hogy az első módszerrel készült konjugátumok, amelyekhez egy lépésben kapcsoltam a biotinil-(TTD-Su)_n biotinilált oligoetilénlikolokat, tisztább terméket adtak, mint a másik módszerrel előállított konjugátumok, ahol a biotinilált oligoetilénlikol felépítése magán a peptiden történt. Ez magyarázható azzal, hogy a CP és VP egyaránt aggregálódásra hajlamos peptid, melyekhez minden további aminosavszármazék egyre nehezebben kapcsolható.

Az ED peptid esetében 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav alapú oligoetilénlikolból (EDA-TEG) készítettem biotinilált konjugátumokat. Ebben az esetben is mindkét módszerrel előállítottam a konjugátumokat. Az első esetben a szilárd hordozón felépített biotinil-EDA-TEG biotiniláló reagenst az ED-peptidet tartalmazó gyantán kapcsoltam az utolsó aminosav (glutaminsav) aminocsoportjához DIC/HOBt kapcsolóreagensek segítségével. A másik esetben a gyantán lévő peptidhez kapcsoltam az előállított Fmoc-EDA-TEG távtartót, majd az Fmoc csoport 20%-os piperidin dimetilformamidos oldatával lehasítottam az Fmoc csoportot. A szabad aminocsoportot ezután biotiniláltam PyBOP/HOBt kapcsolóreagensek segítségével. A biotinil-EDA-TEG-ED konjugátumokat a gyantáról TFA/víz eleggyel 1,2-etánditiol jelenlétében távolítottam el. A nyers biotinil-EDA-TEG-ED konjugátumot RP-HPLC-vel tisztítottam, és tömegspektrometriával azonosítottam. A CP, VP és ED peptidekből készült konjugátumok analitikai adatait a 8. táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat: A biotinilált peptidkonjugátumok analitikai jellemzése

termék	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
biotin-TTD-Su-CP	27,4	1797,1	1796,9
biotin-(TTD-Su) ₂ -CP	28,0	2099,4	2100,0
biotin-(TTD-Su) ₃ -CP	28,5	2401,8	2402,8
biotin-TTD-Su-VP	22,0	1523,7	1523,9
biotin-(TTD-Su) ₂ -VP	21,9	1826,1	1826,4
biotin-(TTD-Su) ₃ -VP	21,9	2128,5	2128,4
biotin-EDA-TEG-ED	28,3	1405,7	1405,7

4.6. A konjugátumok oldhatóságának vizsgálata

Doktori munkám célja az volt, hogy vízdékonny biotin tartalmú peptidkonjugátumokat állítsak elő. A vízdékonyság mérését kétféleképpen valósítottam meg. Az egyik módszer tömegmérésen, a másik RP-HPLC kalibrációs módszeren alapul.

4.6.1. Oldhatóság meghatározása tömegméréssel

A tömegmérésen alapuló vizsgálatnál (61) a tisztított konjugátumokból tömény oldatot készítettem. A konjugátumok kis részletét addig adagoltam 1,2 mL desztillált vízhez, míg opálosodást, zavarosságot tapasztaltam. A mintákat ezután 24 órás szobahőmérsékleten való tárolás után 20 percig centrifugáltam, és a felülúszóból 1 mL-t egy előre kitárazott üvegedénybe pipettáztam. A telített oldatot tartalmazó üvegedényeket liofilizáltam. Az edényeket a továbbiakban exsikkátorban foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam. Az edények tömegét megmérve, és az üres üvegedény tömegét kivonva megkaptam az adott anyag oldhatóságát mg/mL-ben. A kapott adatokat az 9. táblázatban foglaltam össze.

9. táblázat: A peptidek és konjugátumok oldhatóságának tömegméréssel meghatározott eredményei

peptidek és konjugátumok	oldhatóság 25 °C (mg/mL H ₂ O)
H-VVDVSHEDP-NH ₂ (VP)	23,2
biotinil-6-aminohexánsavamid-VP	0,9
biotinil-VP	1,6
biotin-TTD-Su-VP	2,9
biotin-(TTD-Su) ₂ -VP	10,1
biotin-(TTD-Su) ₃ -VP	12,9
H-C(Acm)VVVDVSHEDP-NH ₂ (CP)	18,4
biotinil-6-aminohexánsavamid-CP	0,6
biotinil-CP	1,1
biotin-TTD-Su-CP	2,5
biotin-(TTD-Su) ₂ -CP	3,9
biotin-(TTD-Su) ₃ -CP	8,7
H-EVTC(Acm)VVVD-NH ₂ (ED)	1,6
biotinil-6-aminohexánsavamid-ED	0,6
biotinil-ED	0,4
biotin-EDA_TEG-ED	1,0

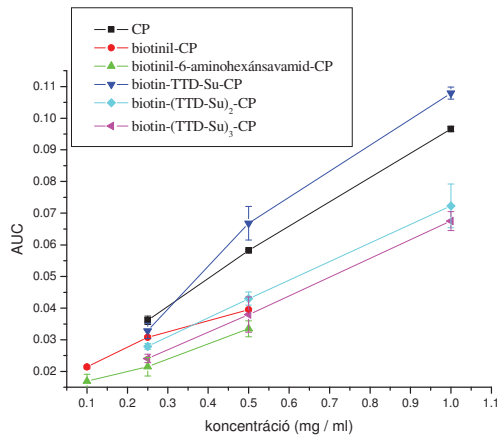
A tömegméréssel történt oldhatóságmeghatározásból láthatjuk, hogy a szabad peptidek oldhatósága biotinilálás, és különösen biotinil-6-aminohexánsav kapcsolása után jelentősen leromlik. A CP és VP peptidek esetében a biotinil-6-aminohexánsavamid tartalmú konjugátumok oldhatósága a szabad peptidhez képest 96%-kal csökkent. Az ED peptid esetében ez az érték 40%. A CP és VP peptidből képezett új biotinil-(TTD-Su)_n konjugátumok oldhatósága viszont minden esetben jóval meghaladta nemcsak a hagyományos biotinil-6-aminohexánsav, hanem a biotin felhasználásával készült peptidkonjugátumét is. Az ED peptid esetében is elegendő volt egy EDA-TEG oligoetilénlikol egység beépítése a biotin és a peptid közé, hogy az oldhatóság meghaladja mind a biotinnal, mind a biotinil-6-aminohexánsavval készült konjugátum oldhatóságát.

4.6.2. Oldhatóság meghatározása HPLC vizsgálattal

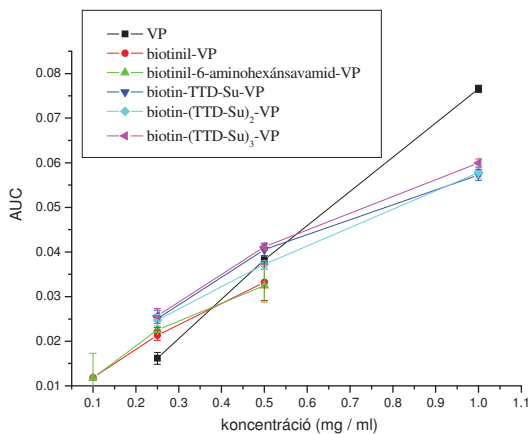
A másik oldhatóságvizsgálathoz RP-HPLC kalibrációt használtam. Három koncentrációban vettem fel a kalibrációs egyenest a CP és VP peptidek biotinil-(TTD-Su)_n konjugátumainak esetében. Minden koncentrációból három párhuzamos injekciót végeztem. Az adott konjugátum oldhatóságát a konjugátum telített oldatának ötszörös hígításából nyert csúcs alatti területből számoltam ki.

Egy adott anyag oldhatóságának méréséhez telített oldatot kellett készítenem. Desztillált vízhez adagoltam a vizsgálandó anyag kis részleteit, amíg zavarosságot nem tapasztaltam. Az edények centrifugálása után a felülúszóból vett mintát tízszeresére hígítottam. A kihígításra azért volt szükség, hogy a vizsgálandó minta oldatának abszorbancia-értéke a kalibrációs intervallumba essen. A kapott csúcs alatti területet a kalibrációs egyenes egyenletébe behelyettesítve megkaptam az adott anyag oldhatóságát mg/mL-ben. Az előállított, HPLC-n tisztított peptidkonjugátumokból 1 mg/mL, 0,5 mg/mL-es, illetve a 0,25 mg/mL-es oldatokat készítettem. A nehezen oldódó biotin, és biotin-6-aminohexánsav tartalmú konjugátumok esetében az elkészített oldatok 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, és 0,1 mg/mL koncentrációjúak voltak.

A kalibráció elkészítéséhez a konjugátumok HPLC kromatogramjában a főcsúcs alatti területet integráltam. Az egyes koncentrációkhoz tartozó párhuzamos mérésekből átlagot és szórást számoltam. Minden konjugátumhoz tartozik egy három pontos, három párhuzamos mérésen alapuló kalibrációs egyenes. A 31. ábrán láthatók a CP peptidből, a 32. ábrán a VP peptidből elkészült konjugátumok kalibrációi. A konjugátumok oldhatóságának adatait a 10. táblázatban foglaltam össze. A HPLC vizsgálattal meghatározott oldhatósági értékek hasonló tendenciát mutatnak. A biotinil-6-aminohexánsavval készült peptidkonjugátumok minden esetben a legrosszabb volt, míg a három TTD-Su távtatót tartalmazó konjugátumok esetében közelítőleg tízszeres oldhatóságnövelést mértem.



31. ábra. A CP peptidből készített biotinilált konjugátumok kalibrációja oldhatóság meghatározására



32. ábra. A VP peptidből készített biotinilált konjugátumok kalibrációja oldhatóság meghatározására

10. táblázat. A peptidek és konjugátumok oldhatóságának RP-HPLC vizsgálattal meghatározott eredményei

konjugátum / peptid	AUC (10x hígított minta)	Számolt oldhatóság (mg/ml)
CP	0,1447	22,3
biotin-6-aminohexánsavamid-CP	0,0168	0,9
biotin-CP	0,0262	1,8
biotin-(TTD-Su)-CP	0,0439	3,0
biotin-(TTD-Su) ₂ -CP	0,0401	4,5
biotin-(TTD-Su) ₃ -CP	0,0660	9,8
VP	0,1334	25,4
biotin-6-aminohexánsavamid-VP	0,0336	1,3
biotin-VP	0,0188	2,8
biotin-(TTD-Su)-VP	0,0297	3,2
biotin-(TTD-Su) ₂ -VP	0,0635	12,8
biotin-(TTD-Su) ₃ -VP	0,0771	15,6

4.7. Citotoxicitás vizsgálatok

Az előállított 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav, illetve a 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin alapú oligoetilénlikol távtartók nem csak biotinilált peptidek oldhatóságát képesek megnövelni. Fontos szerepük lehet még különböző gyógyszerhatóanyagok, célba juttató, illetve hordozó molekulák közötti kapcsolat létrehozásában, valamint oldhatóságuk növelésében. Fontos volt meghatározni, hogy az előállított EDA-TEG, illetve TTD-Su távtartó vegyületek esetében kimutatható-e citotoxikus vagy citosztatikus hatás.

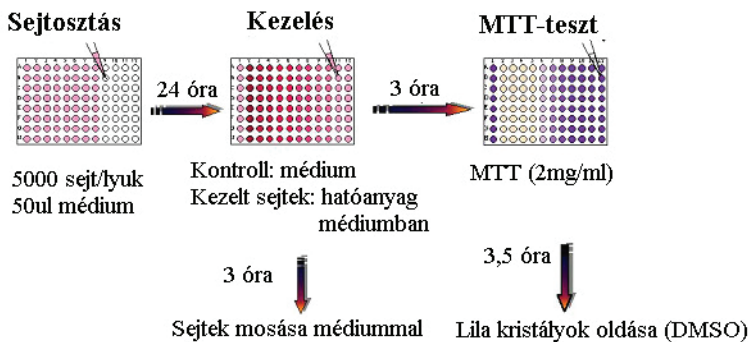
A vegyületek citotoxicitásának meghatározását (33. ábra) alvadásgátolt, teljes vérből preparált PBMC sejteken végeztem. A vizsgálandó anyagból készített különböző koncentrációjú oldatokkal kezeltem a sejteket. A kezeléseket $c=10^{-3}$ - 10^3 $\mu\text{mol/L}$ koncentrációtartományban végeztem el. A citotoxikus hatás mértékét MTT teszt alkalmazásával (62-64) határoztam meg (34. ábra).

A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) sárga színű tetrazolium só, melyet az élő sejtek a mitokondriális dehidrogenáz enzim segítségével lila, DMSO-val kioldható formazán származékká alakítanak át. Mivel ezt az átalakítást csak az élő sejtek képesek megvalósítani, ezért a módszer alkalmas vegyületek citotoxikus hatásának vizsgálatára.

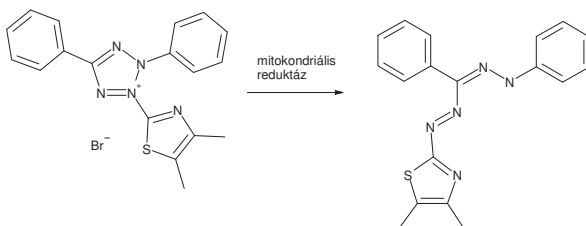
A minták optikai denzitását $\lambda=540/620$ nm-en határoztam meg spektrofotométerrel. A citosztázis mértékét (%) $\lambda=540$ nm-en mért abszorbancia értékek alapján a következő képlettel számítottam:

$$\text{Citotoxicitás (\%)} = (1 - A_{\text{kezelt}} / A_{\text{kontroll}}) \times 100,$$

ahol A_{kezelt} a kezelt sejtek, míg A_{kontroll} a negatív kontroll sejtek esetében mért abszorbanciát jelenti. A citotoxicitás mértékét (%) a koncentráció függvényében ábrázoltam és a kapott görbék segítségével meghatároztam az IC_{50} értékeket. Az IC_{50} értékek azt a koncentrációértéket jelentik, amely a sejtek 50%-ának pusztulását okozzák.

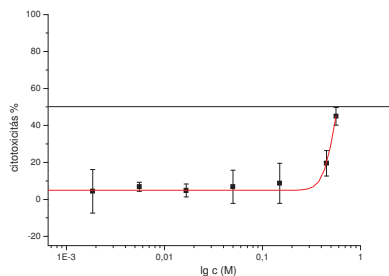


33. ábra: A citotoxicitás meghatározására alkalmazott MTT (tetrazólium) módszer lépéseinek vázlata, forrás: Reményi Judit, PhD dolgozat, 2003, 44. oldal

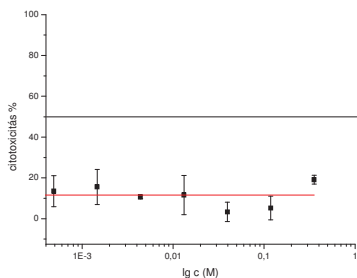


34. ábra: Az MTT reakció vázlatos ábrázolása

Az citotoxicitás mértékét (%) a koncentrációk függvényében ábrázoltam. A citotoxicitás adatokat a 35. és 36. ábra tartalmazza.



35. ábra: TTD-Su citotoxicitás diagramja



36. ábra: TEG citotoxicitás diagramja

A citotoxicitási értékeket az előállított távtartó vegyületek esetében védőcsoport nélküli formában vizsgáltam. Ennek oka, hogy alkalmazásukkor védőcsoport nélkül, peptidekhez, egyéb molekulákhoz kovalensen kötve találhatók meg. Az EDA-TEG távtartó előállítása szilárd hordozón történt. Az Fmoc védőcsoport lehasítása után az EDA-TEG távtartót hasítottam le a gyantáról. Az FmocTTD-Su védőcsoportnélküli változata jóval egyszerűbb volt, hiszen ez a vegyület az Fmoc-TTD-Su távtartó szintézisének köztiterméke. Mivel az általam előállított oligoetilénlikol távtartók oldékonysága nagyon jó vízben, a 0,5 M-os koncentráció elérése nem volt akadály. Ezekből a törzsoldatokból készült hígítási sort teszteltem PBMC sejteken (koncentráció tartományt meg kell adni). A citotoxicitás vizsgálat eredményeiből látható, hogy az előállított EDA-TEG, illetve TTD-Su távtartók önmagukban nem mutatnak citotoxikus hatást 0,5 M koncentráció alatt ($IC_{50} > 50 \text{ mol/dm}^3$).

5. Eredmények összefoglalása

Doktori munkám során elvégeztem három biológiailag aktív, hidrofób IgG peptid szintézisét szilárd fázison Boc, illetve Fmoc stratégiával, valamint olyan biotiniláló reagensek előállítását valósítottam meg, amelyek oligoetilénlikol-származékokat tartalmaznak. Továbbá megvizsgáltam az előállított peptidkonjugátumok oldhatóságát és citotoxikus hatását.

Számos biológiai vizsgálat alapja biotinilált peptidek avidinnel bevont lemezhez való kötődése. Hidrofób jelleggel bíró peptidek esetében azonban a mérés nehezen kivitelezhető, hiszen a mérés közege hidrofíl. Ebben az esetben kézenfekvő megoldás, hogy a peptidek vízzoldékonyságát oligoetilénlikol származékok hozzákapcsolásával növeljük. Ismeretes, hogy a polietilénlikol biológiailag semleges anyag, amely nem zavarja a vizsgált peptid egyéb tulajdonságait, de mivel átlag molekulatömeggel rendelkezik, ez megnehezíti a vegyületek karakterizálását.

Az általam előállított teszt peptidek az IgG Fc régiójából származnak. A H-C(Acm)VVVDVSHEDP-NH₂ H-VVDVSHEDP-NH₂ és a H-EVTCVVVD-NH₂ peptidek biotinilált változatai egyaránt nagyon rossz oldhatósággal rendelkeznek. A tesztpeptidek aggregálódásra igen nagy mértékben hajlamosak, illetve hidrofób *N*-terminálisuk miatt igen rosszul oldódnak vízben. Szilárd fázison, kétféle stratégiával állítottam elő őket, Boc stratégiával manuálisan, illetve Fmoc technikával automata peptidszintetizátorral.

Munkám során eljárást dolgoztam ki 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav, valamint 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin felhasználásával előállítható védett távtartók szintézisére. Az amino- és karboxi-terminálissal rendelkező távtartók használatával elkerülhetők az esetleges melléktermékek képződése.

A 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav esetében az aminoterminális kialakítása eleve védett formában Boc-, illetve Fmoc-védett etilén-diamin (EDA) felhasználásával amidkötés kialakításával történt. A 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav egyik karboxilcsoportját butilészterként védtem, egy Dowex-ioncserélő gyantán alapuló szelektív átésztereződési eljárással. Az így kapott félésztert már egyértelműen tudjuk reagáltatni a védett etilén-diaminnal.

A 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin alapú távtartók szintézisénél a cél szintén az aminosav-jelleg kialakítása volt, amit ebben az esetben karboxilcsoport bevitellel értem el. A diamint borostyánkósavval reagáltatva gyűrűfelnyílás közben amidkötést tudtam létrehozni. A gyűrűfelnyílás során kialakuló amidkötés mellett egy szabad karboxilcsoport is kialakul, így

az aminosav-típust ebben az esetben átmeneti védelem kialakítása nélkül hoztam létre. Az izolált ikeriont, ezután könnyen Boc illetve Fmoc védelemmel tudtam ellátni.

Az előállított védett EDA-TEG, illetve TTD-Su oligoetilénglikol távtartók előállítását egyszerű és olcsó; különleges berendezést nem igényel, a peptidkémiai használatos eszközök segítségével elvégezhető. A sikeresen előállított oligoetilénglikol távtartók egyszerűen alkalmazhatók peptidszintézisben. E származékokat egy lépésben lehet peptidekhez/fehérjékhez, valamint egyéb, gyógyászatban alkalmazható vegyületekhez kapcsolni.

A kiválasztott tesztpeptidek és az előállított oligoetilénglikol távtartók segítségével olyan biotint tartalmazó peptidkonjugátumokat terveztem és állítottam elő, amelynek oldhatósága többszöröse a hagyományos biotinil-6-aminohexánsavas peptideknek. A szilárd fázison előállított tesztpeptidekhez a bevált kapcsolóreagensek segítségével többféleképpen készítettem el a biotinilált oligoetilénglikol tartalmú peptidkonjugátumokat. Az egyik szintézisút szerint szilárdfázison építettem fel az oligoetilénglikolhoz kapcsolt biotint, majd az így felépített biotinilált-oligoetilénglikolt a gyantáról lehasítva egy lépésben kapcsoltam a vizsgálandó peptidhez. A másik módszer szerint magán a tesztpeptiden építettem fel a biotinil-oligoetilénglikolt, a védett távtartók és biotin segítségével. Ez a módszer kisebb, kevésbé aggregálódó peptidok esetében jó alternatívát jelent.

Mivel a távtartók aminosav-típusúak, tehát védhető *N*-terminálissal és szabad karboxilcsoporttal rendelkeznek, ez lehetőséget adott arra, hogy több oligoetilénglikol távtartót tartalmazó, hosszabb konjugátumokat állítsak elő, ezek további oldhatatlan peptidok vizsgálatát könnyíthetik meg. Doktori munkám során megvizsgáltam, hogy lehetséges-e több TTD-Su távtartó egymáshoz kapcsolása, és milyen változást okoz a létrejött peptidkonjugátum oldhatóságában. Mivel az előállított EDA-TEG és TTD-Su távtartók citotoxicitást nem mutatnak 0,5 M koncentrációig, ezért valószínűleg képesek különböző potenciális gyógyszerhatóanyagok vízdékonyságának és farmakokinetikai jellemzőinek javítására.

A munkám jelentősége egy olyan új, irodalomban eddig nem ismert oligoetilénglikol alapú vegyületcsoport kifejlesztése, amely előnyösen befolyásolja a módosított peptidok, hatóanyagok oldhatóságát. Ezeknek a reagenseknek előállítása, és peptidhez való kapcsolása várhatóan új immundiagnosztikai és gyógyászati eljárásokhoz is vezethetnek.

6. Kísérleti rész

6.1. A CP, VP és ED peptidek szintézise

Az előállított peptidek szekvenciája: H-C(Acm)VVVVSHEDP-NH₂, valamint H-VVSVSHEDP-NH₂. A peptideket szilárd fázison manuálisan Boc/Bzl stratégiával, valamint Fmoc/tBu stratégiával automata peptidszintetizátorral egyaránt előállítottam. A H-EVTC(Acm)VVVD-NH₂ peptid előállítása csak automata peptidszintetizátorral Fmoc/tBu stratégiával történt.

6.1.1. Peptidszintézis Boc stratégiával

Szintézishez metilbenzidrilamin (MBHA) gyantát alkalmaztam (gyári kapacitás: 0,73 mmol/g). Mindkét peptide 1g gyantát használtam fel. A gyantát a szintézis előtt diklórmétánnal, etanollal, majd ismét diklórmétánnal mostam. A gyanta előduzzasztása után a gyantát 3x10 mL 10% DIEA-t tartalmazó diklórmétán eleggyel mostam 2 percig. A védett aminosavak kapcsolását többféleképpen valósítottam meg.

Minden esetben 5 mL dimetilformamidban (DMF) oldottam fel a reagenseket. Minden kapcsolásnál DIC/HOBt módszert alkalmaztam. A gyanta mennyiségéhez képest 3 ekvivalens mennyiségű Boc-aminosavat (2,19 mmol), 3 ekvivalens DIC-et (339 µL, 2,19 mmol) és 3,3 ekvivalens HOBt-t (325 mg, 2,41 mmol) használtam a kapcsolásokhoz. A második aminosav felkapcsolása után izatin teszttel ellenőriztem a prolinhoz való kapcsolás sikerességét, minden további esetben ninhidrin próbával ellenőriztem a kapcsolást. Amennyiben a ninhidrin teszt pozitív színreakciót adott, újrapcsolásra volt szükség, különösen nehezen kapcsolódó szakaszok esetén (pl. Val ismétlődő szakaszai). Az újrapcsolást 3 ekvivalens Boc-aminosav (2,19 mmol), 3 ekvivalens PyBOP (1,14 g, 2,19 mmol), 3 ekvivalens HOBt (325 mg, 2,41 mmol), 9 ekvivalens DIEA (1,13 mL, 6,58 mmol) kapcsolóreagensek segítségével hajtottam végre. A kapcsolási idő 1,5 óra volt. A kapcsolások után a gyantát 3x DMF-dal, majd 3x MeOH-lal mostam a melléktermékek, illetve az el nem reagált anyagok eltávolítására. A gyantát 3x diklórmétánnal mostam. A Boc védőcsoport eltávolítása 15 mL 33% TFA/DCM eleggyel történt 2+20 percig. A Boc védőcsoport eltávolítása után a gyantát 5x15 mL 10% DIEA/DCM oldattal semlegesítettem.

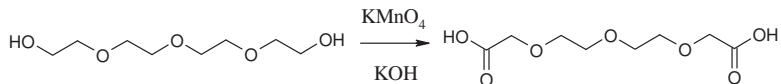
A peptidek hasítása a gyantáról folyékony hidrogén-fluorid segítségével történt. A peptidet tartalmazó gyantát teflon reakcióedénybe tettem, amelybe *p*-krezolt (0,7 g, 6,4 mmol) gyökfogót helyeztem. A reakcióedény felhelyezése után a HF-készüléket 360 Hgmm-re evakuáltam, majd a mintatartó edényt metanol – szárazjég rendszerrel hűtöttem. A HF palackból 20 mL hidrogén-fluoridot desztilláltam a gyantára, majd a hűtést víz-jég rendszerre cseréltem. A reakció ideje 1.5 óra, ezalatt az elegyet végig jeges hűtés mellett kevertettem. A hasítás után a hidrogén-fluoridot CaO csapdába pároltam, majd a reakcióelegyhez 50 mL 4°C-ra hűtött dietil-étert adtam. A nyers peptidet - kicsapódása után - szűrtem, majd 3x50 mL 4°C-ra hűtött dietil-éterrel mostam. A gyanta mellől 3 x 10 mL 10% ecetsav oldattal oldottam ki a peptidet. A peptideket tartalmazó vizes oldatokat ezután csökkentett nyomáson bepároltam, majd az oldatokat liofilizáltam. A nyers peptideket félpreparatív RP-HPLC-n tisztítottam.

6.1.2. Peptidszintézis Fmoc stratégiával

A peptidek szintézisét Fmoc / tBu stratégiával Syro 2000 peptidszintetizátorral hajtottam végre. Rink-amid-MBHA gyantát használtam (gyári kapacitás 0,65 mmol/g) a gyantákat egy üvegfrittel ellátott műanyag reakcióedénybe helyeztem. Egy reakcióedénybe 100 mg gyanta került. A szintetizátor protokoll szerint 4 ekvivalens Fmoc-aminosavszármazékot kapcsolt 4 ekvivalens HOBt (351 mg, 2,6 mmol) és 4 ekvivalens (403 μ L, 2,6 mmol) DIC kapcsolóreagensekkel DMF-ben. Protokoll szerint a szintetizátor minden kapcsolást megismételt. A kapcsolás ideje 2 óra volt. A szintetizátor a kapcsolás alatt rázással segítette a reakcióelegy homogenizálását. Az Fmoc csoport hasítása 40 % piperidin dimetilformamidos oldatával történt. A kapcsolások követése a szintetizátorban nem történt meg. A peptideket a gyantáról 9,5 mL TFA / 0,5 mL víz eleggyel hasítottam 250 mL 1,2-etánditiol gyökfogó mellett. A hasítás ideje 1,5 óra volt. A gyantaszemcsék kiszűrése után a szűrlethez 30 mL dietil-étert adtam, ezáltal a peptidek kicsapódtak. Az elegyeket centrifugáltam (2000RPM, 10 perc), dekantáltam, s a folyamatot még háromszor megismételtem. Ezután hozzáadtam 10 mL 25% acetonitrilt tartalmazó vizes oldatot. Az éternyomok eltávolítása után az oldatokat liofilizáltam. A nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam, és tömegspektrometriával analizáltam.

6.2. 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav alapú távtartók szintézise

6.2.1. TEG szintézise



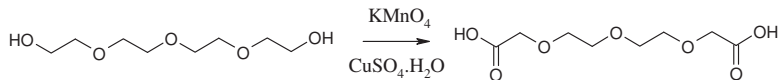
Kiindulási anyag: tetraetilénglikol
Reaktáns: kálium-permanganát
Oldószer: víz
Közeg: bázikus
Termék: 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav (TEG)

Eljárás:

250 mL térfogatú gömblobbikban 150 mL vízben feloldottam a tetraetilénglikolt (10 g, 51 mmol), 4 ekvivalens kálium-hidroxidot (11,4 g, 204 mmol), majd hozzáadtam 4 ekvivalens kálium-permanganátot (2,89 g, 204 mmol). A reakcióelegyet 3 órán keresztül refluxoltattam, amely során kivált a barna színű MnO₂ melléktermék. Ezután a reakcióelegyhez még 2 ekvivalens kálium-permanganátot adtam, és újabb 3 órán keresztül refluxoltattam. A reakcióelegyet rotációs vákuumbepárlón 60°C-on bepároltam, a maradékot cellulózhüvelybe helyeztem és Soxhlet-extrakcióval diklórmétánnal tisztítottam meg a reaktánstól és a sótól. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam 1 napig, majd a szárítószert szűrtem, az oldószert bepároltam. Kitermelés: 60%.

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
TEG	C ₈ H ₁₄ O ₇	18,3	223,2	223,5

6.2.2. TEG szintézise heterogén fázisban



Kiindulási anyag: tetraetilénglikol
 Reaktáns: kálium-permanganát
 Katalizátor: $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 Oldószer: dioxán
 Közeg: semleges
 Termék: 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav (TEG)

Eljárás:

250 mL térfogatú gömblombikba tetraetilénglikolt (10 g, 45 mmol) mértem, majd hozzáadtam 2 ekvivalens kálium-permanganátot (5,0 g, 90 mmol), és 5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -t, valamint 150 mL dioxánt. A kiindulási anyag már szobahőmérsékleten reakcióba lép a kálium-permanganáttal, és barna színű MnO_2 keletkezik. A reakcióelegyet 3 órán keresztül refluxoltattam. A reakcióelegy lehűtése után a katalizátort, valamint a melléktermékként képződött MnO_2 -t, és az el nem reagált reaktánsokat kiszűrtem. A dioxánt rotációs vákuumbepárlón 60°C -on lepároltam. A terméket 30 mL etilacetátban feloldottam és diciklohexilamin (8,1 g, 100 mmol) hozzáadásával, sóképzéssel tisztítottam. A kivált kristályokat szűrtem, etilacetáttal mostam. Kitermelés: 76%.

termék	összetétel	t_{Ret}	$[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt	$[\text{M}+\text{H}]^+$ mért
TEG	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_7$	18,3	223,2	223,5

6.2.3. TEG-OBu szintézise



Kiindulási anyag: 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav

Reaktáns: butil-formiát

Katalizátor: Dowex-ioncserélő gyanta

Oldószer: oktán

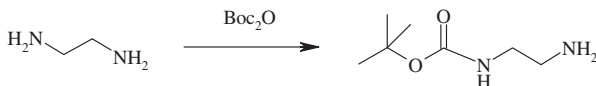
Termék: TEG-OBu

Eljárás:

500 mL-es gömblombikba 5 g Dowex X-5 ioncserélő gyantát, valamint 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsavat (10 g, 45 mmol) tettem, majd 200mL butilformiát:oktán eleggyel (1:1 v/v%) 80 °C-on , folyamatos keverés mellett refluxoltattam 3 órán keresztül. A reflux után az oktán:butil-formiát elegyet dekantáltam, majd az oldószert csökkentett nyomáson lepároltam. A termék szintelen olaj, kitermelés 88%. A terméket további tisztítás nélkül használtam fel.

termék	összetétel	t_{Ret}	$[M+H]^+$ számolt	$[M+H]^+$ mért
TEGOBu	$C_{12}H_{22}O_7$	41,0	279,3	279,5

6.2.4. Boc-EDA szintézise



Kiindulási anyagok: 1,2-etiléndiamin

Reaktáns: Boc_2O

Oldószer: dioxán

Hőmérséklet: 20-25°C

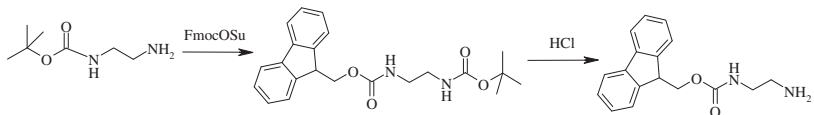
Termék: Boc-1,2-etiléndiamin

Eljárás:

500 mL-es Erlenmeyer lombikban 1,2-etiléndiamint (15 g, 250 mmol) oldottam 200 mL absz. dioxánban. Hozzácepegettem Boc_2O -t (5,5 g, 25 mmol) dioxános oldatát (150mL) 1 órán keresztül. A teljes mennyiség becsepegetése után további 3 órán át a reakcióelegyet erőteljesen kevertetem. Az Erlenmeyer lombikban fehér csapadék vált ki (diBoc-1,2-etiléndiamin), amelyet szűrőssel eltávolítottam. Az oldószert csökkentett nyomáson rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam. A visszamaradt olajat felvettem 100 mL diklórmétánban, és 100 mL 1 M NaOH oldattal háromszor extraháltam. A szerves fázist MgSO_4 -on szárítottam, majd az oldószert csökkentett nyomáson rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam. A nyers termék olaj, kitermelés: 60%. A nyers terméket vákuumdesztillációval tisztítottam, a főfrakciót 110 °C-on gyűjtöttem. Kitermelés: 45%.

termék	összetétel	$[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt	$[\text{M}+\text{H}]^+$ mért
Boc-EDA	$\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$	161,1	161,4

6.2.5. Fmoc-EDA szintézise



Kiindulási anyagok: Boc-1,2-etiléndiamin

Reaktáns: Fmoc-OSu

Oldószer: dioxán

Hőmérséklet: 20-25°C

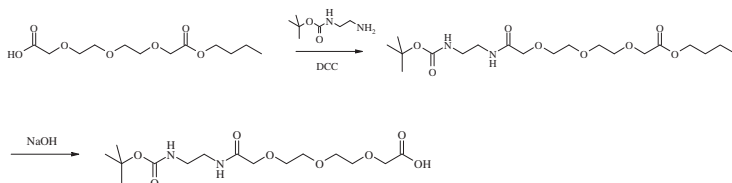
Termék: Fmoc-1,2-etiléndiamin-hidroklorid

Eljárás:

500 mL-es Erlenmeyer lombikba Boc-1,2-etiléndiamint (5 g, 31 mmol) tettem, és feloldottam 200 mL acetonitrilben. Hozzácepegtettem Fmoc-OSu (10,5 g, 31 mmol) acetonitriles oldatát (150mL) 1 órán keresztül. A teljes mennyiség becsepegtése után további 3 órán át kevertettem a reakcióelegyet. Az Erlenmeyer lombikban szilárd fehér csapadék vált ki (Boc-1,2-etiléndiamin-Fmoc), amelyet szűrőssel eltávolítottam. A köztiterméket felvettem 100 mL diklórmetánban, és 0°C-ra hűtöttem. Ezután hozzáadagoltam 100 mL HCl-val telített diizopropilétert. Fehér csapadék vált ki, majd a nyersterméket metanol-éter-hexán elegyből átkristályosítottam. Kitermelés: 72%.

termék	összetétel	$[M+H]^+$ számolt	$[M+H]^+$ mért
Fmoc-EDA	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂	283,3	283,5

6.2.6. Boc-EDA-TEG szintézise



Kiindulási anyagok: Boc-1,2-etiléndiamin, 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav monobutylésztere

Reaktáns: *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid, 1M NaOH

Oldószer: diklórmetán, aceton

Hőmérséklet: 20-25°C

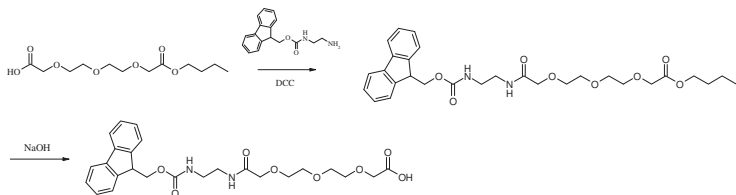
Termék: Boc-EDA-TEG

Eljárás:

250 mL-es Erlenmeyer lombikban 100 mL diklórmetánban feloldottam 5 g ,18 mmol TEG-OBu-t, majd jeges-vizes hűtéssel 0°C-ra hűtöttem a reakcióelegyet. Hozzáadtam 4,1 g, 20 mmol *N,N'*-diciklohexil-karbodiimidet. 15 perc aktiválás után az elegyhez adtam ekvivalens mennyiségű Boc-EDA-t (2,9 g, 18 mmol). Az elegyet hagytam szobahőmérsékletre melegedni, majd 12 óráig kevertettem. A reakcióidő letelte után a reakcióelegyet szűrtem, majd az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam. A Boc-EDA-TEG butilészterét feloldottam aceton – 1M NaOH 1:1 (V/V) elegyben, és további fél órán keresztül kevertettem. Rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam az acetont, majd a reakcióelegyet 100 mL etilacetáttal mostam. A vizes fázist 1M HCl-al átsavanyítottam (pH~2), majd 3x100 mL etilacetáttal extraháltam. A szerves fázist MgSO₄ felett szárítottam. A szárítószert kiszűrtem, majd az oldószert vákuumbepárlón eltávolítottam. A nyersterméket olaj formájában kaptam meg. Kitermelés: 81%. A terméket RP-HPLC segítségével tisztítottam.

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
Boc-EDA-TEG	C ₁₅ H ₂₈ N ₂ O ₈	23,1	365,4	365,1

6.2.7. Fmoc-EDA-TEG szintézise



Kiindulási anyagok: 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav monobutilsztere,

Fmoc-1,2-etiléndiamin

Reaktáns: *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid, 1M NaOH

Oldószer: diklórmétán, aceton

Hőmérséklet: 20-25°C

Termék: Fmoc-EDA-TEG

Eljárás:

250 mL-es Erlenmeyer lombikban 100 mL diklórmétánban feloldottam TEG-OBu-t (5 g, 18 mmol), majd jeges-vizes hűtéssel 0°C-ra hűtöttem a reakcióelegyet. Hozzáadtam 4,1 g, 20 mmol *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid. Egy másik edényben Fmoc-EDA.HCl-hoz (6,4 g, 20 mmol) adtam ekvivalens mennyiségű DIEA-ot 50 mL DMF-ben. 15 perc aktiválás után az elegyhez csepegtettem az Fmoc-EDA oldatát. Az elegyet hagytam szobahőmérsékletre melegedni, majd 12 óráig kevertettem. A reakcióidő letelte után a reakcióelegyet szűrtem, majd az oldószert vákuummotorral felszerelt rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam.

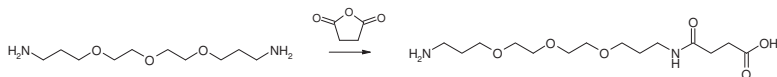
Az Fmoc-EDA-TEG butilszterét feloldottam aceton-1M NaOH 1:1 (V/V) elegyben, és további fél órán keresztül kevertettem. Rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam az acetont, majd a reakcióelegyet 100 mL etilacetáttal mostam. A vizes fázist 1M HCl-al átsavanyítottam (pH~2), majd 3x100 mL etilacetáttal extraháltam.

A szerves fázist MgSO₄-en szárítottam. A szárítószert szűrtem, majd az oldószert vákuumbepárlón eltávolítottam. A kitermelés 85%. A terméket RP-HPLC segítségével tisztítottam.

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
Fmoc-EDA-TEG	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₈	28,3	487,5	487,9

6.3. 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin alapú távtartók

6.3.1. TTD-Su távtartó szintézise



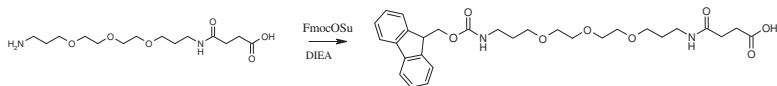
Kiindulási anyag: 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin
Reaktáns: borostyánkősavanhidrid
Oldószer: etilacetát
Hőmérséklet: 20-25°C
Termék: 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamid-borostyánkősav

Eljárás:

Csepegtetőfeltétellel ellátott 100 mL-es gömblombikba bemértem 5 g, 23 mmol 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamint és feloldottam 20 mL etilacetátban. A csepegtetőtölcsérbe 20 mL etilacetátban feloldott borostyánkősavanhidridet tettem (2,3 g, 23mmol). Az oldatot 30 perc alatt csepegtettem be. A kiváló ikerion az oldatot zavarossá tette. Miután a borostyánkősavanhidrid oldatot becsepegtettem, a reakcióelegyet további 1 órán keresztül kevertettem, majd a keverést leállítottam. A keverés leállítása után a TTD-Su leülepedett a lombik aljára. A termékről az etilacetátot, valamint az el nem reagált kiindulási anyagokat dekantáltam, a terméket exsikkátorban szárítottam. A termék szintelen olaj, kitermelés 95%.

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
TTD-Su	C ₁₄ H ₂₈ N ₂ O ₆	28,4	321,4	321,6

6.3.2. Fmoc-TTD-Su távtartó szintézise



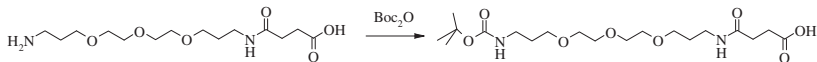
Kiindulási anyag: TTD-Su
 Reaktáns: Fmoc-OSu
 Oldószer: aceton
 Hőmérséklet: 20-25°C
 Termék: Fmoc-TTD-Su

Eljárás:

5 g, 16 mmol TTD-Su-t feloldottam 20 mL desztillált vízben. Hozzáadtam 1,5 ekvivalens mennyiségű diizopropil-etilamint (4,0 mL, 23 mmol). 10 mL acetonban feloldottam ekvivalens mennyiségű (5,4 g, 16 mmol) Fmoc-OSu-t, majd a kiindulási anyag oldatához csepegtettem 30 perc alatt. Az elegyet további 12 órán át kevertettem. Az oldószert lepároltam, és a reakcióelegyehez 10 mL 5%-os NaHCO₃ oldatot adtam, így biztosítottam, hogy a termék karbonsavsó formájában az oldatban maradjon. A reakcióelegyet választótölcsérben 3 x 50 mL etilacetáttal extraháltam. A vizes fázist 1M-os HCl oldattal pH~2-ig savanyítottam. Ekkor az oldatból kiválik a nyerstermék, amelyet 3 x 50 mL etilacetátba extraháltam. A szerves fázisokat egyesítettem, majd MgSO₄ szárítószeren hagytam 2 órán keresztül. A szárítószert kiszűrtem, az elegyet rotációs vákuumbepárlón 10mL-re pároltam. Az elegyhez 0°C-os diizopropil-étert adtam, majd az edényt -20°C-on tároltam 1 órát. A nyerstermék olaj formájában kiválik, és az edény aljára ülepedik. Az oldószert dekantáltam, majd a terméket exsikkátorban szobahőmérsékleten szárítottam. A termék további tisztítás nélkül felhasználható. Kitermelés 92%.

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
Fmoc-TTD-Su	C ₂₉ H ₃₈ N ₂ O ₈	29,3	543,6	543,9

6.3.3. Boc-TTD-Su távtartó szintézise



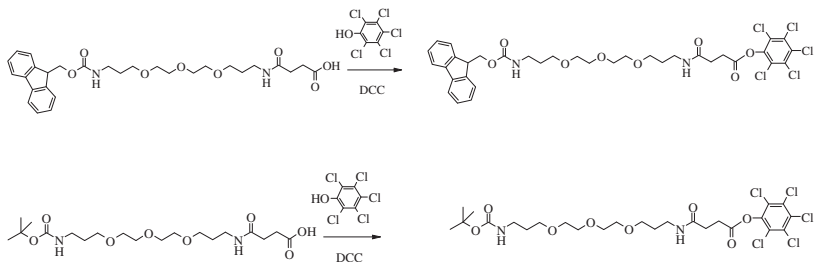
Kiindulási anyag: TTD-Su
 Reaktáns: Boc_2O
 Oldószer: dioxán
 Hőmérséklet: 20-25°C
 Termék: Boc-TTD-Su

Eljárás:

5 g, 16 mmol TTD-Su-t feloldottam 10 mL desztillált vízben. Hozzáadtam 1,5 ekvivalens mennyiségű diizopropil-etilamint (4,0 mL, 23 mmol). 10 mL dioxánban feloldottam 2 ekvivalens mennyiségű (6,9 g, 32 mmol) Boc_2O -t, majd a kiindulási anyag oldatához csepegtettem 30 perc alatt. Az elegyet további 10 órán át kevertettem. Az oldószert lepároltam, és a reakcióelegyhez 10 mL 5%-os NaHCO_3 oldatot adtam, így biztosítottam, hogy a termék karbonsavsó formájában az oldatban maradjon. A reakcióelegyet választótölcsérben 3 x 50 mL etilacetáttal extraháltam. A vizes fázist 1M-os HCl oldattal pH~5-ig savanyítottam, majd 3 x 50 mL etilacetáttal extraháltam. A szerves fázisokat egyesítettem, majd MgSO_4 szárítószeren hagytam 2 órán keresztül. A szárítószert kiszűrtem, az elegyet rotációs vákuumbepárlón 10mL-re pároltam. Az elegyhez 0°C-os diizopropil-étert adtam, majd -20°C-on tároltam 1 órát. A nyers termék olaj formájában kiválik, és az edény aljára ülepedik. Az oldószert dekantáltam, majd a terméket vákuumexszikkátorban szobahőmérsékleten szárítottam. A termék további tisztítás nélkül felhasználható. Kitermelés: 89%.

termék	összetétel	t_{Ret}	$[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt	$[\text{M}+\text{H}]^+$ mért
Boc-TTD-Su	$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$	28,4	421,5	421,8

6.3.4. Boc-TTD-Su-OPcp és Fmoc-TTD-Su-OPcp előállítása



Kiindulási anyagok: Fmoc-TTD-Su,
Boc-TTD-Su
Reaktáns: pentaklór-fenol (HOPcp)
Oldószer: diklórmetán
Hőmérséklet: 20-25°C
Termék: Fmoc-TTD-Su-OPcp
Boc-TTD-Su-OPcp

Eljárás:

Fmoc-TTD-Su-t (1 g, 1,8 mmol) feloldottam 10 mL diklórmetánban. Hozzáadtam 1,5 ekvivalens mennyiségű *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid (0,5 g, 2,7 mmol), illetve pentaklór-fenolt (0,8 g, 3 mmol). A reakcióelegyet további 12 óráig kevertettem. A kivált diciklohexil-ureát kiszűrtem. Az oldószer rotációs vákuumbepárlón lepároltam. 3x50 mL éterrel mostam a visszamaradt csapadékot. A nyersterméket 0°C-os diizopropil-étert adtam, majd -20°C-on tároltam 1 óra hosszat. A nyerstermék olaj formájában kiválik, és az edény aljára ülepedik. Az oldószer dekantáltam, majd a terméket exsikkátorban szobahőmérsékleten szárítottam. A termék további tisztítás nélkül felhasználható. Boc-TTD-Su-OPcp (1 g, 2,4 mmol) esetében a fentivel megegyező eljárást alkalmaztam. Kitermelés Fmoc-TTD-Su-OPcp: 80%, Boc-TTD-Su-OPcp: 73%.

6.3.5. Boc-(TTD-Su)₂ távtartó szintézise oldatban



Kiindulási anyag: Boc-TTD-Su-OPcp
 Reaktáns: TTD-Su
 Oldószer: dioxán
 Hőmérséklet: 20-25°C
 Termék: Boc-(TTD-Su)₂

Csepegtetőfeltétellel ellátott 50 mL-es gömblombikba bemértem 760 mg, 2,4 mmol TTD-Su-t és felfuszpendáltam 10 mL dioxánban. A csepegtetőtölcsérbe 20 mL dioxánban feloldott ekvivalens mennyiségű Boc-TTD-Su-OPcp-t tettem (1,6 g, 2,4 mmol). Az oldatot 30 perc alatt becsepegtettem, majd a reakcióelegyet további 6 órán át erőteljesen kevertettem. A reakcióelegyet szűrtem, majd a dioxánt csökkentett nyomáson rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A visszamaradt olajhoz 10 mL 5%-os NaHCO₃ oldatot adtam. A vizes oldatot választótölcsérben 3 x 50 mL etilacetáttal extraháltam. A vizes fázist 1M-os HCl oldattal pH~5-ig savanyítottam, majd 3 x 50 mL etilacetátba extraháltam. A szerves fázisokat egyesítettem, majd MgSO₄ szárítószeren hagytam 2 órán keresztül. A szárítószert kiszűrtem, az elegyet rotációs vákuumbepárlón 10 mL-re pároltam. Az elegyhez 0°C-os diizopropil-étert adtam, majd az edényt -20°C-on tároltam 1 órát. A nyertermék olaj formájában kiválik. Az oldószert dekantáltam, majd a terméket exsikkátorban szobahőmérsékleten szárítottam. A terméket a további felhasználás előtt RP-HPLC-vel tisztítottam. Kitermelés: 71%.

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
Boc-(TTD-Su) ₂	C ₄₃ H ₆₄ N ₄ O ₁₃	32,4	846,0	846,3

6.3.6. Fmoc-(TTD-Su)₂ távtartó szintézise oldatban



Kiindulási anyag: Fmoc-TTD-Su-OPcp

Reaktáns: TTD-Su

Oldószer: dioxán

Hőmérséklet: 20-25°C

Termék: Fmoc-(TTD-Su)₂

Eljárás:

Csepegtetőfeltétellel ellátott 50 mL-es gömblombikba bemelegítettem 1 g, 1,8 mmol TTD-Su-t és 10 mL dioxánt. A csepegtetőtölcsérbe 10 mL dioxánban feloldott ekvivalens mennyiségű Fmoc-TTD-Su-OPcp-t tettem (1,4 g, 1,8 mmol), és 30 perc alatt becspegeztettem. A reakcióelegyet további 6 órán át erőteljesen kevertettem. A reakcióelegyet szűrtem, majd a dioxánt csökkentett nyomáson rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A visszamaradt olajhoz 10 mL 5%-os NaHCO₃ oldatot adtam. A reakcióelegyet választótölcsérben 3 x 50 mL etilacetáttal extraháltam. A vizes fázist 1M-os HCl oldattal pH~2-ig savanyítottam. Ekkor az oldatból kiválik a nyerstermék, amelyet 3 x 50 mL etilacetátba extraháltam. A szerves fázisokat egyesítettem, majd MgSO₄ szárítószerrel hagytam 2 órán keresztül. A szárítószeret kiszűrtem, az elegyet rotációs vákuumbepárlón 10 mL-re pároltam. Az elegyhez 0°C-os diizopropil-étert adtam, majd az edényt -20°C-on tároltam 1 órát. A nyerstermék olaj formájában kiválik, és az edény aljára ülepedik. Az oldószerrel dekantáltam, majd a terméket exsikkátorban szobahőmérsékleten szárítottam. A terméket a további felhasználás előtt RP-HPLC-vel tisztítottam. Kitermelés: 81%.

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
Fmoc-(TTD-Su) ₂	C ₄₃ H ₆₄ N ₄ O ₁₃	33,2	846,0	846,4

6.4. Biotinilálás

6.4.1 Biotinilált CP, VP, ED peptidek előállítása

A CP, VP, illetve ED peptidet tartalmazó gyantákból 200 mg-ot üvegfrittel és csappal ellátott edénybe helyeztem. A gyantákat 5 mL DMF-dal 15 percen keresztül duzzasztottam. Egy üvegedénybe bemértem 3 ekvivalens biotint (47,6 mg, 0,19 mmol), és 2 mL DMF-ot adtam hozzá. Az oldat zavaros, tejfehér színű lett. Ehhez az oldathoz adtam 10 ekvivalens DIEA-t (110 μ L, 0,65 mmol) is. Egy másik üvegedénybe kimértem a PyBOP (100 mg, 0,19 mmol), illetve HOBt (25,7 mg, 0,19 mmol) kapcsolóreagenseket, majd feloldottam 2 mL DMF-ben. Az edényt addig rázogattam, míg az oldat kitisztult. A két edény tartalmát egyesítettem, és folyamatosan rázogattam. Körülbelül 5 perc rázás után az egyesített oldat kitisztult. Ebben a formában adtam hozzá a duzzasztott gyantához. A biotinil-6-aminohexánsavat 3 mL DMSO-ban szuszpendáltam. A biotinilálás ideje 2 óra volt. A gyantát ezután mostam 3x5 mL DMSO-val, majd 3x5 mL DMF-dal, végül 3x5 mL DCM-nal. A biotinilált peptidek hasítása a szabad peptid hasításával megegyezően történt. A biotinilált peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam, és tömegspektrometriával analizáltam.

6.4.2. TEG alapú biotinilált konjugátumok szintézise

6.4.2.1. Biotin-EDA-TEG szintézise szilárd fázison Boc stratégiával

50 mL-es Erlenmeyer lombikba bemértem 2 ekvivalens 390 mg, 1,4 mmol TEG-OBu-t, 10 mL DMF-ben feloldottam, majd hozzáadtam 2,4 mmol Cs_2CO_3 (0,78 g) 1 mL vízzel készült oldatát, majd 1,5 órát kevertettem szobahőmérsékleten. A keverés alatt előkészítettem 1 g Merrifield gyantát (kapacitás: 0,7 mmol/g). A céziumsót tartalmazó oldatot bepároltam motorvákuummal, 10 mL toluolt öntöttem rá, és ezzel is bepároltam a víznyomok eltávolítása céljából, ezt a műveletet kétszer megismételtem. A TEG-OBu céziumsóját 10 mL DMF-ben oldottam, hozzáadtam a gyantát, és 24 órán át 40°C -on kevertettem. Ezek után mostam a gyantát 3xDMF, 2x90%-os etanol, 1x absz. EtOH, 3xDCM, 3xEtOH alkalmazásával, majd P_2O_5 felett szárítottam exsikkátorban.

A butil védőcsoport eltávolítását 2x10 mL 1M NaOH/DMF 1:1 arányú elegyével hajtottam végre, a reakcióidő 5+10 perc volt. A gyantán kialakuló Na-sót 10 mL 10% 1N HCl-t tartalmazó dioxánnal semlegesítettem. A butil védőcsoport hasításának eredményességét Malachit-zöld indikátorral ellenőriztem. A DIC-et (325 μL , 2,1 mmol) és (284 mg, 2,1 mmol) HOBt-t DMF-ben oldottam, hozzáadtam a gyantához, és 30 percig előaktiváltam. Ezután hozzáadtam 2 mL DMF-ban feloldott 2,1 mmol (336 mg) Boc-EDA-t. A kapcsolat ideje 2 óra volt. A kapcsolat sikerességét Malachit-zöld indikátorral ellenőriztem. A Boc védőcsoport lehasítása 33% (V/V)-os TFA/DCM eleggyel történt, a semlegesítés 10% (V/V)-os DIEA/DCM-nal. A szabad aminocsoporthoz biotint (512 mg, 2,1 mmol) kapcsoltam PyBOP (1,93 g, 2,1 mmol), HOBt (284 mg, 2,1 mmol) DIEA (1,2 mL, 7 mmol) kapcsolóreagensek segítségével.

A biotin-EDA-TEG-t tartalmazó gyantát teflonedénybe tettem, amelybe *p*-krezolt (0,7g, 6,4 mmol) gyökfogót helyeztem. A teflonedénybe felhelyezése után a HF-készüléket 360 Hgmm-re evakuáltam, majd a mintatartó edényt metanol – szárazjég rendszerrel hűtöttem. A HF palackból 20 mL hidrogén-fluoridot desztilláltam a gyantára, majd a hűtést víz-jég rendszerre cseréltem. A reakció ideje 2 óra volt. A hasítás után a hidrogén-fluoridot CaCl_2 csapdába pároltam, majd a reakcióelegyhez 50 mL 4°C -ra hűtött diizopropil-étert adtam. Az edényeket centrifugáltam (5000 RPM, 10 perc), dekantáltam, újabb adag diizopropil-étert adtam hozzá, és a folyamatot még kétszer megismételtem. Ezután hozzáadtam 10 mL 25% acetonitrilt tartalmazó vizes oldatot.

Az oldatot szobahőmérsékleten vákuumexszikkátorban tartottam 20 percig. Az éternyomok eltávolítása után az oldatokat liofilizáltam. A nyerterméket RP-HPLC-n tisztítottam.

6.4.2.2. Biotin-EDA-TEG szintézise szilárd fázison Fmoc stratégiával

A szintézishez 1 g Wang gyantát használtam (kapacitás: 0,93 mmol/g). A gyantát a szintézis előtt diklórmétánnal, etanollal, majd ismét diklórmétánnal mostam. A gyantát közvetlenül a szintézis előtt 10 mL DMF-dal duzzasztottam. Háromszoros mennyiségű 792 mg, 2,8 mmol TEG-OBu-t 5 mL dimetilformamidban (DMF) oldottam fel 3 ekvivalens DIC (441 μ L, 2,8 mmol) és 0,3 ekvivalens DMAP (35 mg, 0,3 mmol) kapcsolóreagensekkel együtt. A kapcsolási idő 3 óra volt. A kapcsolások után a gyantát 3x DMF-dal, majd 3x MeOH-lal mostam. A butil védőcsoport eltávolítását 2x10 mL 1M NaOH/DMF 1:1 arányú elegyével végeztem, a reakcióidő 5+10 perc volt. A gyantát ezután 10 mL 10% 1N HCl-t tartalmazó dioxánnal kezeltem. Az Fmoc-EDA-t (804 mg, 2,8 mmol) 5 mL dimetilformamidban (DMF) oldottam fel a 3 ekvivalens DIC (441 μ L, 2,8 mmol) és 3 ekvivalens HOBt (385 mg, 2,8 mmol) kapcsolóreagensekkel együtt. A kapcsolási idő 1,5 óra volt. A kapcsolat után a gyantát 3x5 mL DMF-dal, majd 3x5 mL DCM-nal mostam. A kapcsolat sikerességét Malachit-zöld indikátorral ellenőriztem. Az Fmoc védőcsoport eltávolítását 15 mL 40% piperidin/DMF eleggyel végeztem 2+2+5+10 percig. Az Fmoc védőcsoport eltávolítását ninhidrin teszttel igazoltam. A biotinilálás 3 ekvivalens biotin (683 mg 2,8 mmol) és 3 ekvivalens PyBOP (1,4 g, 2,8 mmol), 3 ekvivalens HOBt (385 mg, 2,8 mmol) 10 ekvivalens DIEA (1,7 mL, 10 mmol) kapcsolóeleggyel történt. A biotin-EDA-TEG-et a gyantáról 9,5 mL TFA / 0.5 mL víz eleggyel hasítottam. Üvegedénybe helyeztem a gyantát, jeges-vizes hűtés mellett hozzáadtam a hasítóelegyet, majd 1,5 órán keresztül kevertettem.. A gyantaszemeket kiszűrtem. Ezután az elegyhez jéghideg dietil-étert adtam, ezáltal a termék kicsapódott. Az elegyeket centrifugáltam (5000 RPM, 10 perc), dekantáltam, újabb adag étert adtam hozzá, és a folyamatot még kétszer megismételtem. A biotin-EDA-TEG-et 10 mL 25% acetonitrilt tartalmazó vizes oldatból liofilizáltam. A nyerterméket RP-HPLC-n tisztítottam, és tömegspeltrometriával azonosítottam.

termék	összetétel	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
biotin-EDA-TEG	C ₂₀ H ₃₄ N ₄ O ₈ S	28,3	491,5	491,7

6.4.2.3. Biotin-EDA-TEG konjugálása ED peptidhez

A peptidet tartalmazó gyantát (200 mg) 5 mL DMF-ben duzzasztottam 5 percig. A gyanta mosása után, 5 mL 1:1 arányú DMSO:DMF elegyben feloldottam 3 ekvivalens biotin-EDA-TEG-et, (93 mg, 0,19 mmol) 3 ekvivalens PyBOP-t (100 mg, 0,19 mmol), 3 ekvivalens HOBt-t (25,7 mg, 0,19 mmol), és 10 ekvivalens DIEA-t (1,6 mL, 9,3 mmol). A biotin-EDA-TEG konjugálását folyamatos kevertettem 3 órán keresztül. A reakció letelte után a gyantát mostam 3x5 mL DMSO-dal, 3x5 mL DMF-dal, majd 3x5 mL DCM-nal. A konjugátum hasítása a szabad peptiddel megegyező módszerrel történt. A nyers konjugátumot RP-HPLC-vel tisztítottam.

6.4.2.4. Biotin-EDA-TEG-ED konjugátum előállítása Fmoc-EDA-TEG segítségével.

A peptidet tartalmazó gyantát (200 mg) 5 mL DMF-ban duzzasztottam 5 percig. A gyanta mosása után, 5 mL 1:1 arányú DMSO:DMF elegyben feloldottam 3 ekvivalens Fmoc-EDA-TEG-et, (93 mg, 0,19 mmol) 3 ekvivalens PyBOP-t (100 mg, 0,19 mmol), 3 ekvivalens HOBt-t (25,7 mg, 0,19 mmol), és 10 ekvivalens DIEA-t (1,6 mL, 9,3 mmol). A gyanta mosása után, 5 mL 1:1 arányú DMSO:DMF elegyben feloldottam 3 ekvivalens biotint (47 mg, 0,19 mmol), 3 ekvivalens PyBOP-t (100 mg, 0,19 mmol), 3 ekvivalens HOBt-t (25,7 mg, 0,19 mmol), és 10 ekvivalens DIEA-t (1,6 mL, 9,3 mmol). A biotin-EDA-TEG konjugálását folyamatos kevertettem 3 órán keresztül. A reakció letelte után a gyantát 3x5 mL DMSO-dal, 3x5 mL DMF-el, majd 3x5 mL DCM-nal mostam. A konjugátum hasítása a szabad peptiddel megegyező módszerrel történt. A nyers konjugátumot RP-HPLC-vel tisztítottam.

termék	t_{Ret}	$[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt	$[\text{M}+\text{H}]^+$ mért
biotin-EDA-TEG-ED	28,3	1405,7	1405,7

6.4.3. TTD alapú biotinilált konjugátumok

6.4.3.1.. Biotin-TTD-Su előállítása oldatban

20 mL-es Erlenmeyer lombikba bemértem 100 mg, 0,2 mmol biotinil-*N*-hidroxiszukcinimidet. (biotin-NHS) és feloldottam 10 mL DMF-ban. Az edényt felmelegítettem 50 °C-ra, és hagytam szobahőmérsékletre visszahűlni. Csepegtetőtölcsérbe 5 mL DMSO-ban feloldott ekvivalens mennyiségű TTD-Su-t tettem (120 mg, 0,2 mmol). Az oldatot 10 perc alatt becsepegtettem, és a reakcióelegyet további 12 órán át kevertettem. A reakcióelegyet szűrtem, majd a DMF-ot csökkentett nyomáson motorvákuummal felszerelt rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A visszamaradt szuszpenzióhoz 15 mL 5%-os NaHCO₃ oldatot adtam. A vizes oldatot szűrtem, majd választótölcsérben 20 mL etilacetáttal mostam. A vizes fázist 1M-os HCl oldattal pH~2-ig savanyítottam. Ekkor az oldatból kivált a nyerstermék, amelyet 3 x 50 mL etil-acetátba extraháltam. A szerves fázisokat egyesítettem, majd MgSO₄ szárítószeren hagytam 2 órán keresztül. A szárítószeret kiszűrtem, az elegyet rotációs vákuumbepárlón 10 mL-re pároltam. Az elegyhez 0°C-os diizopropil-étert adtam, majd -20°C-on tároltam 1 órát. A nyerstermék olaj formájában kiválik, és az edény aljára ülepedik. Az oldószeret dekantáltam, majd a terméket exsikkátorban szobahőmérsékleten szárítottam. A terméket a további felhasználás előtt RP-HPLC-vel tisztítottam, és tömegspektrometriával azonosítottam.

termék	t _{Ret}	[M+H] ⁺ számolt	[M+H] ⁺ mért
biotinil-(TTD-Su)	21,31	547,7	547,5

6.4.3.2. Biotin-(TTD-Su)_n (n=1,2,3) szintézise szilárd fázison Boc stratégiával

A szintézishez 1-1 g Merrifield gyantát használtam (kapacitás: 0,73 mmol/g). A gyantát a szintézis előtt diklórmétánnal, etanollal, majd ismét diklórmétánnal mostam. A gyanta előduzzasztása után a gyantát 3x10 mL 10% DIEA-t tartalmazó diklórmétán eleggyel mostam 2 percig. A Boc-TTD-Su (924 mg, 2,2 mmol) 5 mL dimetilformamidban (DMF) oldottam fel a 3 ekvivalens DIC (340 µl, 2,2 mmol) és 3 ekvivalens HOBt (297 mg, 2,2 mmol) kapcsolóreagensekkel együtt. A kapcsolási idő 1,5 óra volt. A kapcsolások után a gyantát 3x5 mL DMF-dal, majd 3x5 mL MeOH-lal mostam a melléktermékek, illetve az el nem reagált anyagok eltávolítására.

A Boc védőcsoport eltávolítása 15 mL 33% TFA/DCM eleggyel történt 2+20 percig, majd a gyantát 15 mL 10% DIEA/DCM oldattal semlegesítettem. A második és harmadik Boc-TTD-Su-t 5 mL dimetilformamidban oldottam, szintén DIC/HOBt kapcsolóreagensekkel. A kapcsolás ideje 1,5 óra volt. A kapcsolás sikerességét minden kapcsolás után ninhidrin próbával igazoltam. Egy üvegedénybe 3 ekvivalens biotint (537 mg, 2,2 mmol) és 10 ekvivalens DIEA-t (1,3 mL, 7,3 mmol) tettem és feloldottam 2 mL DMF-ben. Másik üvegedényben a PyBOP-ot (1,1 g, 2,2 mmol), illetve HOBt-ot (297 mg, 2,2 mmol) oldjuk 2 mL DMF-ben. Az edények tartalmát egyesítettem és a gyantához adtam, majd 2 órán keresztül reagáltattam. A gyantát ezután mostam 3x5 mL DMSO-dal, majd 3x5 mL DMF-dal, végül 3x5 mL DCM-nal. A biotin-(TTD-Su)_n-t tartalmazó gyantát teflonedénybe tettem, amelybe *p*-krezolt (0,7g, 6,4 mmol) gyökfogót helyeztem. A teflonedény felhelyezése után a HF-készüléket 360 Hgmm-re evakuáltam, majd a mintatartó edényt metanol – szárazjég rendszerrel hűtöttem. A HF palackból 20 mL hidrogén-fluoridot desztilláltam a gyantára, majd a hűtést víz-jég rendszerre cseréltem. A reakció ideje 1.5 óra, ezalatt az elegyet végig jeges hűtés mellett kevertettem. A hasítás után a hidrogén-fluoridot CaO csapdába pároltam, majd a reakcióelegyhez 50 mL 4°C-ra hűtött dietil-étert adtam. A nyerspeptidet kicsapódása után szűrtem, majd 3x50 mL 4°C-ra hűtött dietil-éterrel mostam. A gyanta mellől 3x 10 mL 10% ecetsav oldattal oldottam ki a nyersterméket. A vizes oldatokat ezután csökkentett nyomáson bepároltam, majd az oldatokat liofilizáltam. A termékeket RP-HPLC segítségével tisztítottam.

6.4.3.3. Biotin-(TTD-Su)_n (n=1,2,3) szintézise szilárd fázison Fmoc stratégiával

A szintézishez Wang gyantát használtam (1-1 g, kapacitás: 0,95 mmol/g). A gyantát a szintézis előtt diklórmétánnal, etanollal, majd ismét diklórmétánnal mostam. A gyantát közvetlenül a szintézis előtt 10 mL DMF-nal duzzasztottam. Az Fmoc-TTD-Su-t 5 mL dimetilformamidban (DMF) oldottam fel a 3 ekvivalens DIC (433 μ L, 2,8 mmol) és 0,3 ekvivalens DMAP (37 mg, 0,3 mmol) kapcsolóreagensekkel együtt. A kapcsolási idő 3 óra volt. A kapcsolások után a gyantát 3x5 mL DMF-dal, majd 3x5 mL MeOH-lal mostam.

Az Fmoc védőcsoport eltávolítását 15 mL 40% piperidin/DMF eleggyel végeztem 2+2+5+10 percig. Az Fmoc védőcsoport eltávolítását ninhidrin teszttel igazoltam. A második Fmoc-TTD-Su-t 5 mL 1:1 arányú DMF-DMSO elegyben oldottam, szintén DIC/HOBt kapcsolóreagensekkel. A kapcsolás ideje 1,5 óra volt. A kapcsolás sikerességét szintén ninhidrin próbával igazoltam.

A biotin-(TTD-Su)_n termékeket a gyantáról 9,5 mL TFA / 0,5 mL víz eleggyel hasítottam. Üvegedénybe helyeztem a gyantát, jeges-vizes hűtés mellett hozzáadtam a hasítóelegyet, majd 1,5 órán át kevertettem. A gyantaszemeket kiszűrtem. Ezután az elegyhez jéghideg diizopropil-étert adtam, ezáltal a nyers termék kicsapódott. A szuszpenziót centrifugáltam (5000 RPM, 10 perc), dekantáltam, újabb adag diizopropil-étert adtam hozzá, és a folyamatot még kétszer megismételtem. Ezután hozzáadtam 10 mL 25% acetonitrilt tartalmazó vizes oldatot. Az oldatokat szobahőmérsékleten vákuumexsikkátorban tartottam 20 percig. Az éternyomok eltávolítása után az oldatokat liofilizáltam. A nyerstermékeket RP-HPLC-vel tisztítottam, és tömegspektrometriával analizáltam.

6.4.3.4. Biotin-(TTD-Su)_n (n=1,2,3) konjugálása CP és VP peptidekhez

A peptidet tartalmazó gyantákat (200-200 mg) 5 mL DMF-ben duzzasztottam 5 percig. A gyanták mosása után, minden egyes gyantához 5 mL 1:1 arányú DMSO:DMF elegyben feloldottam 3 ekvivalens biotin-(TTD-Su)_n-t, (0,19 mmol) 3 ekvivalens HOBt-t (25,7 mg, 0,19 mmol), és DIC-t (29,4 µL, 0,19 mmol). A biotin-(TTD-Su)_n kapcsolását folyamatos kevertetem 3 órán keresztül. A reakció letelte után a gyantát 3x5 mL DMSO-dal, 3x5 mL DMF-dal, majd 3x5 mL DCM-nal mostam. A konjugátum hasítása a szabad peptiddel megegyező módszerrel történt. A nyers konjugátumot RP-HPLC-vel tisztítottam.

6.4.3.5. Biotin-(TTD-Su)_n (n=1,2,3) felépítése CP és VP peptideken Fmoc stratégiával

200-200 mg peptidet tartalmazó gyantákat 5 mL DMF-ben 5 percig duzzasztottam. Az Fmoc-TTD-Su-t (100 mg, 0,19 mmol) 5mL dimetilformamidban (DMF) oldottam fel 3 ekvivalens PyBOP (100 mg, 0,19 mmol) és 3,3 ekvivalens HOBt (25,7 mg, 0,19 mmol), 10 ekvivalens DIEA (110 µL, 0,65 mmol) kapcsolóreagensekkel együtt. A kapcsolási idő 3 óra volt. A kapcsolások után a gyantát 3x DMF-dal mostam. Az Fmoc védőcsoport eltávolítása 40% piperidin / DMF eleggyel történt 2+2+5+10 percig. A további Fmoc-TTD-Su egységek kapcsolásához a reagenseket 5 mL 1:1 arányú DMSO:DMF elegyben oldottam fel. A TTD-Su távtartó aminocsoportjának biotinilálása 3 ekvivalens biotin (47,6 mg, 0,19 mmol) 3 ekvivalens PyBOP (100 mg, 0,19 mmol), 3,3 ekvivalens (25,7 mg, 0,19 mmol) HOBt, 10 ekvivalens DIEA-val (110 µL, 0,65 mmol) történt. A biotin-(TTD-Su)_n konjugátum hasítása az Fmoc stratégiával szintetizált peptid hasításával megegyező módon történt. A termékeket RP-HPLC segítségével tisztítottam.

6.4.3.6. Biotin-(TTD-Su)_n (n=1,2,3) felépítése CP és VP peptideken Boc stratégiával

A szintézishez 100-100 mg peptidet tartalmazó gyantát használtam. A gyanták előduzzasztása után a gyantákat 3x10 mL 10% DIEA-t tartalmazó diklórmetán eleggyel mostam 2 percig. A Boc-TTD-Su (924 mg, 2,2 mmol) 5 mL dimetilformamidban (DMF) oldottam fel a 3 ekvivalens PyBOP (1,1 g, 2,2 mmol), 3 ekvivalens HOBt (297 mg, 2,2 mmol), és 10 ekvivalens DIEA (1,3 mL, 7,3 mmol) kapcsolóreagensekkel együtt. A kapcsolási idő 1,5 óra volt. A kapcsolás után a gyantát 3x5 mL DMF-dal, majd 3x5 mL MeOH-lal mostam a melléktermékek, illetve az el nem reagált anyagok eltávolítására. A Boc védőcsoport eltávolítása 10 mL 33% TFA/DCM eleggyel történt 2+20 percig. A Boc védőcsoport eltávolítása után a gyantát 15 mL 10% DIEA/DCM oldattal semlegesítettem. A második Boc-TTD-Su-t 5 mL 1:1 (V/V) arányú DMF-DMSO elegyben oldottam, szintén PyBOP/HOBt kapcsolóreagensekkel. A kapcsolás ideje 1,5 óra volt. A kapcsolás sikerességét ninhidrin próbával igazoltam. A biotinilálás 3 ekvivalens biotin (537 mg, 2,2 mmol) és 10 ekvivalens DIEA-t (1,3 mL, 7,3 mmol) 3 ekvivalens PyBOP (1,1 g, 2,2 mmol), illetve 3,3 ekvivalens HOBt (297 mg, 2,2 mmol) kapcsolóeleggyel történt 5 mL DMF-ban 3 órán keresztül. A gyantát ezután 3x5 mL DMSO-dal, majd 3x5 mL DMF-dal, végül 3x5 mL DCM-nal mostam. A biotin-(TTD-Su)_n konjugátum hasítása a Boc stratégiával szintetizált peptid hasításával megegyező módon történt. A termékeket RP-HPLC-vel tisztítottam, és tömegspektrometriával analizáltam.

6.5. Analitikai módszerek

6.5.1. A kapcsolási és hasítási reakciók követése

Ninhidrin próba

Reagensek: A: 10% (w/v) ninhidrin/etanol
B: 80% (w/v) fenol/etanol
C: 4 $\mu\text{mol/L}$ KCN/piridin-víz 98:2 (v/v)

A három reagensből 2-2 cseppet egy kisméretű kémcsőbe cseppentettem, összeráztam, majd a gyantából egy kis mennyiséget beletettem (néhány mg-ot, kb 50 gyantaszemcsét). 105 °C-on 5 percig reagáltattam. Ugyanezekkel a reagensekkel gyanta nélkül kontroll kísérletet is végeztem. Amennyiben mind az oldat, mind a gyantaszemcsék színe változatlan (sárga), a gyantán nincs szabad aminoscsoport, a kapcsolási reakció hatásfoka 99% felett volt. Ha gyantaszemcsék vagy az oldat kék, a kapcsolási reakció nem teljes, megismétltem a kapcsolási lépést.

Izatin próba

A prolin szabad iminocsoportjának kimutatásához a ninhidrin próba A, B és C reagenséhez egy negyedik komponenst is cseppentettem.

„D” reagens: 2 g (13,6 mmol) izatint 60 mL benzilalkoholban 2 óra hosszat kevertettem, leszűrtem, majd a szűrlet 50 mL-éhez 2,5 g (9,4 mmol) Boc-Phe-t adtam. A továbbiakban a próbát ugyanúgy végeztem el, mint a Kaiser-féle ninhidrin próbát.

Malachit-zöld próba

A Malachit-zöld próba szabad karboxilcsoportok kimutatását teszi lehetővé szilárd hordozón. A gyantaszemcsék kis részletéhez pár csepp 5% (w/v) Malachit-zöld indikátort tartalmazó etanolt adtam. A reakció ideje 5 perc, szobahőmérsékleten. Ezután az oldatot dekantáltam, majd tiszta etanollal mostam a gyantaszemcséket, míg átlátszó oldatot

kaptam. Ugyanezzel a módszerrel a kiindulási gyantával kontroll kísérletet is végeztem. A gyantaszemcsék zöld elszíneződése esetén a hordozó szabad karboxilcsoportokat tartalmaz.

6.5.2. HPLC vizsgálatok

Az előállított vegyületek tisztaságvizsgálatára nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszert használtam. A vegyületek tisztítására félpreparatív Supelcosil (10mm x 25 cm, 300 Å, 12 µm) C₁₈-csoporttal módosított oszlopot, a tisztaság ellenőrzésére Phenomenex Synergi (4,6 mm x 25 cm, 80 Å, 4 µm) C₁₈ csoporttal módosított analitikai oszlopot használtam.

HPLC rendszerben (Knauer UV-detektor, 2 db eluensadagoló pumpa, mintaadagoló, eluenskeverő) a detektálást 220 nm-en, UV detektorral végeztem. Mindkét esetben bináris gradiens elúciót alkalmaztam, ahol a teljes áramlási sebesség fél-preparatív oszlopon 4mL/perc, analitikai oszlopon 1mL/perc volt.

A használt két eluens a következő:

A eluens: nagytisztaságú víz, 0,1% (v/v) TFA

B eluens: nagytisztaságú víz-acetonitril (1:4), 0,1% (v/v) TFA.

A gradienst a peptidek tisztítása során hidrofóbítástól függően változtattam. Általában 5-15% B eluenssel kezdtem az elúciót, majd percenként 1%-kal emeltem a B eluens koncentrációját 40-50%-ig.

Az anyagok analitikai HPLC oszlopon történt tisztaságvizsgálata során minden esetben ugyanazt a gradien selúciót alkalmaztam, 5% B eluens tartalmazó eluensleggyel ekvilibráltam az oszlopot, majd 40 perc alatt a B eluens arányát 95%-ra vittem fel. Ezután az oszlopot 5 percig mostam 95% B eluenssel, majd újra ekvilibráltam 5% B eluenssel.

Hosszabb használat után az oszlop regenerálása szükséges, ehhez az eluensen kívül 60% izopropanol / víz (v/v) C eluens használtam, gradien selúcióval mostam az oszlopot, 60 perc alatt a C eluens arányát 60 %-ig vittem fel, majd ugyancsak 60 perc alatt 60%-ról 0%-ra csökkentettem.

6.5.3. Aminosav analízis

Az aminosavanalízis során az ELTE Kémiai Intézet Szerves Kémiai Tanszék Mikroanalitikai Laboratóriumában a peptideket 6M-os HCl oldattal, vákuumban, 110 °C-on, 24 óra alatt elhidrolizálták, majd a sósav bepárlása és ninhidrines származékképzés után automata aminosavanalizátor (Beckmann 6300, Palo Alto, USA) segítségével határozták meg az aminosavmennyiséget. Ebből számítottam ki a peptidek aminosav-összetételét.

6.5.4. Tömegspektrometria

A peptidek tömegspektrometriás azonosítása ESI-MS (Elektrospray-ionization) módszerrel, Bruker Daltonics Esquire 3000 ion-csapdás tömegspektrométer készüléken (Bréma, Németország) történt. A minták feloldására minden esetben nagy tisztaságú MS acetonnitrilt használtunk.

6.6. Oldhatóság vizsgálatok

6.6.1. Oldhatóság mérése HPLC készülékkel

Az előállított, HPLC-n tisztított, szárított peptidkonjugátumokból μg pontossággal bemértünk 300-400 μg közötti mennyiséget egy 1,5 mL térfogatú Eppendorf csőbe. Ezekhez automata finn pipettával megfelelő mennyiségű kétszer desztillált vizet adtam az 1,0 mg/mL-es koncentrációjú törzsoldat eléréséhez. A törzsoldatból 100-100 μL kivételével két másik Eppendorf csőben elkészítettem el a 0,5 mg/mL-es, illetve a 0,25 mg/mL-es oldatokat. A nehezen oldódó biotin és biotin-6-aminohexánsav tartalmú konjugátumok esetében az elkészített oldatok 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, és 0,1 mg/mL koncentrációjúak voltak.

A telített oldatok elkészítésénél egyenként 50 mg konjugátumot helyeztem Eppendorf csövekbe. Minden mintához 100 μL kétszer desztillált vizet adtam. Az oldatokat Vortex készüléken ráztam 5 percig. Amennyiben az oldat kitisztult, további konjugátumot adtam hozzá, amíg a zavarosság meg nem jelent. A telített oldatokat ezután 24 órán keresztül 4°C-on tároltam. A mintákat másnap Büchi Eppendorf-centrifuga segítségével centrifugáltam 5000 RPM-mel 20 percig. A felülúszóból 100 μL -es Hamilton fecskendővel 10 μL telített oldatot vettem, majd kétszer desztillált vízzel 50 μL -re egészítettem ki.

A kalibrációhoz minden koncentrációból egyenként 80 μL -t pipettáztam a mintaadagoló edényekbe, a telített oldatok kihígításából egyenként 60 μL -t.

A peptidkonjugátumok oldatait Waters RP-HPLC készülékkel vizsgáltam, Phenomenex Synergi (4,6 mm x 25 cm, 80 Å, 4 μm) C₁₈ csoporttal módosított analitikai oszlopon. A HPLC rendszerben (Waters UV-detektor, 2 db eluensadagoló pumpa, eluenskeverő, automata mintaadagoló, rendszervezérlő). A detektálást 220 nm-en végeztem. Az áramlási sebesség 1 mL/perc volt.

Az eluensek összetétele: A eluens: desztillált víz, 0,1% (V/V) TFA; B eluens: desztillált víz-acetonitril (1:4), 0,1%(V/V) TFA.

A gradienst minden konjugátum esetében ugyanaz volt. 5% B eluenssel kezdtem az elúciót, majd 25 percen keresztül 60%-ra emeltem a B eluens koncentrációját.

Ezután az oszlopot 5 percig mostam 95% B eluenssel, majd 10 percig gradienst újra 5% B eluens arányra állítottam be.

A Waters RP-HPLC automata mintaadagolójának mintatartálya 100 μL térfogatú. Az elkészült oldatokból 80 μL -t tettem a mintatartályba. Az injektor minden mintát 3 alkalommal injektált be, egyenként 20 μL -t.

6.6.2. Oldhatóság mérése tömegméréssel

A tisztított, konjugátumokat exszikátorban szárítottam 48 órán keresztül P_2O_5 felett. 1,5 mL-es Eppendorf csőbe 1,2 mL desztillált vizet pipettáztam. Az Eppendorf csőbe adagoltam 30 mg peptidkonjugátumot rázogatózás közben. Az oldatok opálosodása után az edényeket 1 órán át kevertettem, majd 24 órán keresztül tároltam szobahőmérsékleten. A mintákat ezután 20 percig centrifugáltam (4000 RPM), és a felülúszóból 1 mL-t egy előre elkészített, tárazott üvegedénybe pipettáztam. A telített oldatot tartalmazó üvegedényeket liofilizáltam. Az edényeket a továbbiakban exsikkátorban foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottam, majd megmértem a tömegüket.

6.7. Citotoxicitási vizsgálatok

6.7.1. PBMC preparálás

12 mL alvadásgátolt, teljes vért (vérvételi cső adatai: Vacuette 3,5 mL (citrát) 9NC) 12 mL RPMI 1640 szérummentes médiummal (ICM) hígítottam egy 50 mL-es Falcon csőben. A hígított vért 15 mL-es centrifuga-csővekben Ficoll-Hypaque fölé rétegeztük (3mL Ficoll-Hypaque + 6mL hígított vér), majd 30 percig centrifugáltuk (2000rpm, 18°C, fékezés nélkül) (64). Az elvált limfocita réteget 3 mL-es műanyag pipettával izoláltam, majd 50 mL-es Falcon csőbe gyűjtöttem, és centrifugáltam (1500RPM, 10 perc, 18°C). A centrifugált sejteket felszuszpendáltam, és 1 Falcon csőbe egyesítettem, és kiegészítettem 13 mL ICM-mel. Az egyesített sejtuszuspenziót újra centrifugáltam (1000RPM, 15 perc, 18°C).

A centrifugált sejteket felszuszpendáltam 2 mL teljes médiumban (CM). A teljes RPMI-1640 médium 10% FCS-t (hővel inaktivált magzati borjú szérum, foetal calf serum), L-glutamint (2mM) és gentamicint (160µg/ mL) tartalmazott. A sejtszámlálást 0,4 % (w/v) tripánkék oldat segítségével végeztem, Bürker kamrában (általában: 190 µL tripánkék festékoldat + 10 µL sejtuszuspenzió). A sejtszámlálást Bürker kamrában mikroszkóp alatt végeztem.

A sejteket 96 lyukú szuszpenziós lemezre (Sarstedt Round Bottom Suspension Cells) osztottam szét 50 000 sejt/200 µL CM/lyuk mennyiségben. A mérést megelőzően a lemezt 12 órára inkubátorba helyeztem (37 °C, 2 % CO₂).

6.7.2. A távtartók citotoxicitásának meghatározása kolorimetriás tetrazólium (MTT) teszt alkalmazásával

A kísérlet első napján a sejteket egy 96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottam 50 µL szérumtartalmú médiumban. Következő nap a negatív kontrollként használt sejtekre 150 µL szérummentes médiumot, míg a kezelt sejtekre 50 µL szérummentes médiumot és 100 µL szérummentes médiumban oldott különböző koncentrációjú hatóanyagot raktam. A kezeléseket $c=10^{-3}$ - 10^3 µmol/L koncentrációtartományban végeztem el. Három óra elteltével a sejteket 135-135 µL szérummentes médiummal mostam 3-szor, majd lyukanként ugyanennyi szérumtartalmú médiumot kaptak.

A vegyületek eltávolítását követően 45 μL MTT-oldatot ($c=2\text{ mg/mL}$) adtam a sejtekhez lyukanként, majd 4 órási inkubálás után oldottam a lila kristályokat 100 μL DMSO-ban. Végül a minták optikai denzitását $\lambda=540\text{ nm}$ -en Elisa Reader (Labsystems, Finnország) segítségével mértem.

A citotoxicitás mértékét (%) $\lambda=540\text{ nm}$ -en mért abszorbancia értékek alapján a következő képlettel határoztam meg:

$$\text{Citotoxicitás (\%)} = (1 - A_{\text{kezelt}} / A_{\text{kontroll}}) \times 100,$$

ahol A_{kezelt} a kezelt sejtek, míg A_{kontroll} a negatív kontroll sejtek esetében mért abszorbanciát ($\lambda=540\text{ nm}$) jelenti.

A citotoxicitás mértékét (%) a koncentráció függvényében ábrázoltam, és a kapott görbék segítségével meghatároztam az IC_{50} értékeket. Az IC_{50} értékek azt a koncentrációértéket jelentik, amely a sejtek 50%-ának pusztulását okozzák.

7. Irodalomjegyzék

- 1.) Jones J. H.: A revised guide to abbreviations in peptide science and a plea for conformity (2003) *J. Pept.Sci.* **9** 1-8.
- 2.) Bogusiewicz A., Mock N.I., Mock, D.M.: A biotin-protein bond with stability in plasma (2005) *Anal. Biochem.* **337**, 98-102.
- 3.) Bartlett W.C., Noelle R.J.: A cell surface ELISA to detect interleukin-4-induced class II MHC expression on murine B cells (1987) *J. Immunol. Methods* **105**, 79-85.
- 4.) Scott D., Nitecki D.E., Kindler H., Goodman J.W.: Immunogenicity of biotinylated hapten-avidin complexes (1984) *Mol. Immunol.* **21**, 1055-1060.
- 5.) Takahashi T., Arakawa H., Maeda M., Tsuji A.: A new biotinylating system for DNA using biotin aminocaproyl hydrazide and glutaraldehyde (1989) *Nucleic Acid Research* **17**, 4899-4900.
- 6.) Uray K., Medgyesi D., Hilbert Á., Sármay G., Gergely J., Hudecz F.: Synthesis and receptor binding of IgG1 peptides derived from the IgG Fc region. (2004) *J. Mol. Recognition* **17**, 95-105.
- 7.) Miron T., Wilchek M.: A Simplified Method for the Preparation of Succinimidyl Carbonate Polyethylene Glycol for Coupling to Proteins (1993) *Bioconjugate Chem.* **4**, 568-569.
- 8.) Roberts M. J., Bentley, M. D., Harris J. M.: Chemistry for peptide and protein PEGylation (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 459-476.
- 9.) Veronese F. M.: Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions (2001) *Biomaterials* **22**, 405-417.
- 10.) Slama J., Rando R.R.: The synthesis of glycolipids containing a hydrophilic spacer-group (1981) *Carbohydrate Research* **88**, 213-221.
- 11.) Boumrah D., Campbell M.M., Fenner S., Kinsman R.G.: Spacer molecules in peptide sequences: Incorporation into analogues of atrial natriuretic factor (1997) *Tetrahedron* **53**, 6977-6992.
- 12.) Lee H., Park T.G.: A novel method for identifying PEGylation sites of protein using biotinylated PEG derivatives (2002) *J. Pharm. Sci.* **92**, 97-103.
- 13.) Wu D., Pardridge W.M.: Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 254-259.

- 14.) Salem A.K., Cannizzaro S.M., Davies M.C., Tendler S.J.B., Roberts C.J., Williams P.M., Shakesheff K.M.: Synthesis and characterisation of a degradable poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) copolymer with biotinylated end groups (2001) *Biomacromolecules* **2**, 575-580.
- 15.) Kaiser K., Marek M., Haselgrübler T., Schindler H., Gruber H.J.: Basic Studies on Heterobifunctional Biotin-PEG Conjugates with a 3-(4-Pyridyldithio)propionyl Marker on the Second Terminus (1997) *Bioconjugate Chem.* **8**, 545-551.
- 16.) Mack J., Kienle S., Leipert D., Redemann T., Kraas W., Jung G.: Heterobifunctionalized tetraethylene glycol: A spacer for surface attachment of viral peptide epitopes for ELISA and derivatization of membrane modifying peptides (1999) *Letters in Peptide Science* **6**, 135-142.
- 17.) Combs G. F. Jr. (2008). *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. San Diego: Elsevier, Inc. ISBN 9780121834937
- 18.) Green N.M.: Avidin (1975) *Adv. Protein Chem.* **29**, 85-113.
- 19.) Heitzmann H., Richards. F.M.: Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **9**, 71.
- 20.) Bayer E.A., Wilchek M., Skutelsky E.: Affinity cytochemistry: the localization of lectin and antibody receptors on erythrocytes via the avidin-biotin complex. (1976) *FEBS Lett.*, **68**(2), 240-244.
- 21.) Jiang Y., Breslav M., Khare R.K., McKinney A., Becker J.M., Naider F.: Synthesis of alpha-factor analogues containing photoactivable and labeling groups, (1995) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **45**, 106-115.
- 22.) Baeza C.R., Uden A.: Orthogonal solid-phase synthesis of a monobiotinylated analog of Neuropeptide (1992) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **39**, 195-199.
- 23.) Sondermann P., Huber R., Oosthuizen V., Jacob U.: The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-FcγRIII complex (2000) *Nature* **406**, 267-273.
- 24.) Du Vigneaud V., Ressler C., Swan C.M., Roberts C.W., Katsoyannis P.G.: The synthesis of oxytocin. (1954) *J. Am. Soc.* **76**, 3115-3121.
- 25.) Merrifield R.B.: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.
- 26.) Carpino L.A., Han G.Y.: The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group (1972) *J. Org. Chem.* **37**, 3404-3409.

- 27.) Atherton E., Clive D.L.J., Sheppard R.C.: Polyamide supports for polypeptide synthesis (1975) *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 6584-6585.
- 28.) Goodman M.: *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics* (Ed., Georg Thieme Verlag) Stuttgart, (2004) Vol. E 22.
- 29.) Walker B.: Solid-phase peptide synthesis In: Peptide antigens. A practical approach. (Ed: Wisdom, G.B. Oxford University Press) Oxford (1994) 27-81.
- 30.) Matsueda G.R., Stewart, J.M.: A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides (1981) *Peptides* **2**, 45-50.
- 31.) Rink H.: Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxydiphenyl-methylester resin (1987) *Tetrahedron Letters* **28**, 3787-3790.
- 32.) König W., Geiger R.: New method for the synthesis of peptides: Activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide by using 1-hydroxybenzotriazoles as additives (1970) *Chem. Ber.*, **103**, 788-798.
- 33.) Steglich W., Höfle, G.: N,N-dimethyl-4-pyridinamine, a very effective acylation catalyst (1969) *Angew. Chem. International Edition in English* **8**, 981.
- 34.) Gisin B.F.: The preparation of Merrifield-resins through total esterification with cesium salts (1973) *Helv. Chim. Acta* **56**, 1476-1482.
- 35.) Barany G., Kneib-Cordonier N., Mullen D.G.: Solid-phase peptide synthesis: A silver anniversary report (1987) *Int. Pept. Prot Res.* **30**, 705-739.
- 36.) Fields G.B., Tian Z., Barany G.: „Principles and practice of solid-phase peptide synthesis” in: Synthetic peptides. (Ed.: Grant, G.A. Freeman and Co, New York) (1992) 77-183.
- 37.) Kisfaludy L., Schön I.: Preparation and application of pentafluorophenyl esters of 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids for peptide synthesis (1983) *Synthesis* 325-327.
- 38.) Carpino L.A.: 1-Hydroxy-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115** 4397-4398.
- 39.) Carpino L.A., El-Faham A., Minor C.A., Albericio F., Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolpyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis (1994) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 201-203.
- 40.) Castro B., Dormoy J. R., Evin G., Selve C. Reactifs de couplage peptidique IV(1) L’hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxitriméthylamino phosphonium (B.O.P.) (1975) *Tetrahedron Letters* **14**, 1219-1222.

- 41.) Le-Nguyen D., Heitz A., Castro B.,: Renin substrates. Part 2. Rapid solid phase synthesis of the ratine sequence tetradecapeptid using BOP reagent (1987) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*. 1915-1919.
- 42.) Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I: Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides (1970) *Anal. Biochem.* **34**, 595-598.
- 43.) Kaise, E., Bossinger C.D., Colescott R.L., Olser D.B. Color test for terminal prolyl residues in the solid-phase synthesis of peptides (1980) *Anal Chem. Acta.*, **118**, 149-151.
- 44.) Chang C-D., Felix A.M., Jimenez M.H., Meienhofer J., Solid-phase peptide synthesis of somatostatin using mild base cleavage of N^α-9-fluorenylmethyloxycarbonyl-amino acids (1980) *Int. J. Peptide Prot. Res.* **15** 485-494.
- 45.) Tam J.P., Heath W.F., Merrifield R.B. S_N2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethylsulfide: Evidence and application in peptide synthesis (1983) *J.Am.Chem.Soc.* **105** 6442-6455.
- 46.) Tam J.P., Heath W.F., Merrifield R.B. Mechanism for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulphonic acid – trifluoroacetic acid – dimethyl sulphide (1986) *J.Am.Chem.Soc.* **108** 5242-5251.
- 47.) Aberico F., Kneib-Cordonier N., Biancalana S., Gera L., Masada R.I., Hudson D., Barany, G. Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions (1990) *J.Org.Chem.* **55** 3730-3743.
- 48.) King D.S., Fields C.G., Fields G.B., A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid-phase peptide-synthesis (1990) *Int. Pept. Prot. Res.* **36** 255-266.
- 49.) Gairi M.I., Lloyd-Williams P., Albericio, F., Giralt, E. Convergent solid-phase peptide-synthesis (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 181-182.
- 50.) Hopp T.P., Woods K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78** 3824-3828.
- 51.) Menger F. M., Lee C., Synthetically useful oxidations at solid sodium permanganate surfaces (1981) *Tetrahedron Letters* **12** 1655-1656.

- 52.) Butenandt J., Eppler R., Wallenborn E. U., Eker A.P.M., Gramlich V., Carell T., A comparative repair study of thymine- and uracil- photodimers with model compounds and a photolyase repair enzyme (2000) *Chem. Eur. J.* **6** 67-72.
- 53.) Menger F. M., Lee C., Oxidation with solid potassium permanganate, (1979) *J. Org. Chem.* **44** 3446-3448.
- 54.) Saitoh M., Fujisaki S., Ishii Y., Nishiguchi T.: Convenient selective monoesterification of α , ω -dicarboxylic acids catalyzed by ion-exchange resins (1996) *Tetrahedron Letters* **37** 6733-6736.
- 55.) Kocis P., Issakova, O., Sepetov N.F., Lebl M., Kemp's Triacid Scaffolding for Synthesis of Combinatorial Nonpeptide Uncoded Libraries (1995) *Tetrahedron Letters* **36** 6623-6626.
- 56.) Ham, J-Y., Kang, H-S., A new convenient method for the Monoprotection of α,ω -alkanediamines (1994) *Bull. Korean Chem. Soc.* **15** (12) 1025-1027.
- 57.) Song A., Wang X., Zhang J., Marík J., Lebrilla C.B., Lam K.I.: Synthesis of hydrophilic and flexible linkers for peptide derivatization in solid phase (2004) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **14** 161-165.
- 58.) Jiang Y, Breslav M, Khare RK, McKinney A, Becker JM, Naider F., Synthesis of alpha-factor analogues containing photoactivable and labeling groups, (1995) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **45**, 106-115.
- 59.) Baeza C.R., Uden A., Orthogonal solid-phase synthesis of a monobiotinylated analog of Neuropeptide Y, (1992) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **39**, 195-199.
- 60.) Attardi M.E., Porcu, G.P., Taddei, M. Malachite green, a valuable reagent to monitor the presence of free COOH on the solid phase (2000) *Tetrahedron Letters* **41** 7391-7394
- 61.) Malavolta L., Nakaie C. R. Peptide dissociation in solution or bound to a polymer: comparative solvent effect (2004), *Tetrahedron* **60**, 9417-9424.
- 62.) Gerlier D. and N. Thomasset. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation (1986) *J Immunol Methods* **94(1-2)** 57-63.
- 63.) Mosmann T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays (1983) *J. Immunol. Meth.*, **65** 55-63.
- 64.) Jurcevic S., Hills, A., Pasvol G., Davidson R. N., Ivanyi, J., Wilkinson, R. J. T cell responses to a mixture of Mycobacterium tuberculosis peptides with complementary HLA-DR binding profiles. *Clin Exp Immunol*, 1996. **105(3)**: 416-21.

Összefoglalás

Doktori munkám során olyan eljárásokat dolgoztam ki, amelyek eredményeképpen kereskedelmi forgalomban kapható oligoetilénglikolokból (tetraetilénglikol, 3,6,9-trioxaundekán-1,11-dikarbonsav és 4,7,10-trioxa-1,13-tridekándiamin) kiindulva, Boc és Fmoc védőcsoportokkal védett aminosav-típusú távtartókat tudtam előállítani.

Az előállított oligoetilénglikol távtartók segítségével többféle felépítési módszerrel biotin tartalmú petidkonjugátumokat állítottam elő.

A disszertációban felvázolt, irodalomban nem ismert módszerrel, biotinilált oligoetilénglikolt tartalmazó peptidkonjugátumok mellett a felvázolt módszer tetszés szerint alkalmazható bármely vizsgálándó peptidre, hatóanyagra, gyógyszermolekulára. A hosszabb oligoetilénglikolt tartalmazó reagensek erősen hidrofób, de biológiailag aktív vegyületek vizsgálatát könnyíthetik meg. A védett oligoetilénglikol építőelemek felhasználásával személyre szabható, eltérő hosszúságú és eltérő oldhatóságú konjugátumok állíthatók elő. A több oligoetilénglikol távtartót tartalmazó, hosszabb konjugátumok az erősen hidrofób peptidek esetében jelentős megnövelték azok oldhatóságát.

A biotinilált-oligoetilénglikolok és konjugátumaik előállítása egyszerű, olcsó, különleges berendezést nem igénylő, a peptidkémiaiban használatos eszközök segítségével végrehajtható.

Mivel az előállított távtartók citotoxicitást nem mutatnak humán PBMC sejteken, ezért alkalmasak lehetnek különböző potenciális gyógyszerhatóanyagok vízzoldékonyságának és farmakokinetikai jellemzőinek javítására.

A munkám jelentősége egy olyan új, irodalomban nem ismert oligoetilénglikol alapú vegyületcsoport kifejlesztése, amely előnyösen befolyásolja a módosított peptidek, hatóanyagok oldhatóságát. Ezeknek a reagenseknek előállítása, és peptidhez való kapcsolása várhatóan új immundiagnosztikai és gyógyászati eljárásokhoz is vezethetnek.

Summary

During my PhD studies I have developed processes with which I have prepared Boc- and Fmoc-protected spacer moieties from commercially available oligoethyleneglycol derivatives (tetraethyleneglycol, 3,6,9-trioxaundecane-1,11-dicarboxylic acid and 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine). With the oligoethylene spacers I have synthesized biotin containing peptide conjugates *via* different routes.

The new procedure described (to the best of my knowledge not published before) can be applied to label not only peptides, but proteins or amino-group containing drug molecules as well with biotinyl-oligoethyleneglycol. Reagents containing longer oligoethyleneglycol moiety can facilitate the study of highly hydrophobic but biologically active compounds. Using the protected oligoethyleneglycol building blocks customized conjugates of different solubility can be prepared. The longer conjugates, containing more than one tetraethyleneglycol moieties, can significantly increase the solubility of hydrophobic peptides.

The preparation of the biotinylated oligoethyleneglycols and their conjugates is simple, cheap, does not need specific equipment, can be performed with the labware generally used in peptide chemistry.

The spacers prepared show no cytotoxicity on human PBMC cells, therefore they might be applied to enhance the solubility and pharmacokinetics of potential drugs.

The importance of my studies lies in developing a new set of oligoethyleneglycol based compounds which can favourably affect the solubility of peptide, drugs labelled with it. The production of these reagents and their attachment to peptides may open new paths towards immunodiagnostic and therapeutic procedures.